

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-503362

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)4月13日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 P 21/02	Z N A C	9282-4B	
A 6 1 K 39/00		H 9284-4C	
39/35	A B F	9284-4C	
39/36		9284-4C	
		9050-4B	
		C 1 2 N 15/ 00	A
	審査請求 未請求	予備審査請求 有	(全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平5-507748	(71) 出願人	イミュロジク ファーマスーティカル コーポレーション
(86) (22) 出願日	平成4年(1992)10月16日		アメリカ合衆国 02154 マサチューセツツ、ウォルサム、リンカン ストリート 610
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)4月18日	(72) 発明者	ロジャーズ、ブルース エル.
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 2 / 0 8 6 9 4		アメリカ合衆国 02178 マサチューセツツ、ベルモント、リチャードソン ロード 54
(87) 国際公開番号	W O 9 3 / 0 8 2 8 0	(74) 代理人	弁理士 倉内 基弘 (外1名)
(87) 国際公開日	平成5年(1993)4月29日		
(31) 優先権主張番号	7 7 7 , 8 5 9		
(32) 優先日	1991年10月16日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
(31) 優先権主張番号	8 0 7 , 5 2 9		
(32) 優先日	1991年12月13日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レコンビトープペプチド

(57) 【要約】

本発明は、レコンビトープペプチドと呼ばれるT細胞刺激活性を有するペプチドを提供する。この発明のレコンビトープペプチドは、好ましくは、同じ若しくは異なる蛋白質抗原に由来する少なくとも2つのT細胞エピートープを含み、好ましくは、少なくとも2つの領域を含む(各領域は、好ましくは、ヒトT細胞刺激活性を有し且つ蛋白質抗原に由来する少なくとも1つのT細胞エピートープを含む)。この発明のレコンビトープペプチドは、蛋白質アレルゲン、自己抗原又は他の蛋白質抗原から導くことが出来る。この発明は又、個人における蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原に対する感受性を診断する方法、かかる感受性を治療する方法、並びに1種以上のレコンビトープペプチドを含む治療用組成物をも提供する。この発明は、更に、個人が感受性である蛋白質抗原が未知若しくは不明確なT細胞エピートープを有する場合にこの発明のレコンビトープペプチドをデザインするための方法を提供する。

請求の範囲

1. ヒトT細胞刺激活性をそれぞれ有する少なくとも2つの領域を含む単離したレコンビトープペプチドであって、該領域がそれぞれ蛋白質アレルギーの少なくとも1つのT細胞エピトープを含み、該領域が同じ又は異なる蛋白質アレルギーに由来する、上記の単離したレコンビトープペプチド。
2. それぞれヒトT細胞刺激活性を有する少なくとも3つの領域を含む、請求の範囲第1項に記載の単離したレコンビトープペプチド。
3. 蛋白質アレルギーにおいて天然の構成と異なる構成で領域を配置した、請求の範囲第1項に記載の単離したレコンビトープペプチド。
4. 領域を同じ蛋白質アレルギーから導いた、請求の範囲第3項に記載の単離したレコンビトープペプチド。
5. 領域を同じ蛋白質アレルギーから導き、それらの領域を非隣接的構成で配置した、請求の範囲第1項に記載の単離したレコンビトープペプチド。
6. 非隣接的領域をアミノ酸によって規定し、それらの領域が導かれる蛋白質アレルギーがアミノ末端からカルボキシ末端までの逐次の順序で配置されたアミノ酸を含み、レコンビトープの当該非隣接的領域を非逐次の順序で配置した請求の範囲第5項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

- b) Der f I に由来する領域と Der f II に由来する領域；
 c) Amb a I に由来する領域と Amb a II に由来する領域；
 d) Lol b I に由来する領域と Lol b IX に由来する領域；
 e) Cry j I に由来する領域と Cry j II に由来する領域。

13. 少なくとも2つの領域が同じ群の異なるアレルギーに由来する、請求の範囲第1項に記載の単離したレコンビトープペプチド。
14. レコンビトープペプチドが Der p I に由来する少なくとも1つの領域及び Der f I に由来する1つの領域を含む、請求の範囲第13項に記載の単離したレコンビトープペプチド。
15. 少なくとも2つの領域が同じ科の異なる蛋白質アレルギーに由来する、請求の範囲第1項に記載の単離したレコンビトープペプチド。
16. 少なくとも2つの領域がそれぞれ、Amb a I.1、Amb a I.2、Amb a I.3 及び Amb a I.4 からなる群に由来する、請求の範囲第15項に記載の単離したレコンビトープペプチド。
17. 最小免疫グロブリンE刺激活性を有する、請求の範囲第1項に記載の単離したレコンビトープペプチド。
18. 最小免疫グロブリンE刺激活性を有する、請求の範囲第5項に記載の単離したレコンビトープペプチド。
19. 領域が由来する蛋白質アレルギーが免疫グロブリンEに結合するより実質的に低い程度に該免疫グロブリンEに結合する、請求の範囲第1項に記載の単離したレ

7. 少なくとも2つの領域が同じ属からの異なる蛋白質アレルギーに由来する、請求の範囲第1項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

8. 属を、Dermatophagoides属；Felis属；Ambrosia属；Lolium属；Cryptogeria属；Alternaria属；Alder属；Betula属；Quercus属；Olea属；Artemisia属；Plantago属；Parietaria属；Canine属；Bjettella属、Apie属；Peripianeta属からなる群より選択する、請求の範囲第7項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

9. 少なくとも2つの領域が交差反応性の種に由来する、請求の範囲第7項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

10. レコンビトープペプチドが、Dermatophagoides pteronyssinusに由来する少なくとも1つの領域及び Dermatophagoides farinosusに由来する少なくとも1つの領域を含む、請求の範囲第9項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

11. 少なくとも2つの領域が同じ種の異なる蛋白質アレルギーに由来する、請求の範囲第1項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

12. レコンビトープペプチドを、下記からなる群より選択する、請求の範囲第11項に記載の単離したレコンビトープペプチド：

a) Der p I に由来する領域と Der p II に由来する領域；

コンビトープペプチド。

20. 領域が由来する蛋白質アレルギーが免疫グロブリンEに結合するより実質的に低い程度に該免疫グロブリンEに結合する、請求の範囲第5項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

21. 蛋白質アレルギーに特異的な免疫グロブリンEに結合しないか、又は、レコンビトープペプチドの該免疫グロブリンEへの結合が起きたとしても、かかる結合が該蛋白質アレルギーに感受性の個人のかかりのパーセンテージにおいてマスト細胞若しくは好塩基球からの媒介物質の放出を生じない、請求の範囲第1項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

22. 蛋白質アレルギーに特異的な免疫グロブリンEに結合しないか、又は、レコンビトープペプチドの該免疫グロブリンEへの結合が起きたとしても、かかる結合が該蛋白質アレルギーに感受性の個人のかかりのパーセンテージにおいてマスト細胞若しくは好塩基球からの媒介物質の放出を生じない、請求の範囲第5項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

23. 前記のレコンビトープペプチドが由来する蛋白質アレルギーに対してアレルギー性である個人に投与すると、その個人の当該蛋白質アレルギーに対するアレルギー応答を緩和する、請求の範囲第1項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

24. 前記のレコンビトープペプチドが由来する蛋白質

アレルギーに対してアレルギー性である個人に投与すると、その個人の当該蛋白質アレルギーに対するアレルギー性を緩和する、請求の範囲第5項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

25. 領域を、ペプチドX（配列番号7）、ペプチドY（配列番号8）、ペプチドZ（配列番号9）、ペプチドA（配列番号10）、ペプチドB（配列番号11）、ペプチドC（配列番号77）（それぞれ、図4に示してある）からなる群より選択する、請求の範囲第1項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

26. 領域が、ペプチドX（配列番号7）、ペプチドY（配列番号8）及びペプチドZ（配列番号9）（それぞれ図4に示してある）を含む、請求の範囲第25項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

27. 領域が、ペプチドX（配列番号7）、ペプチドY（配列番号8）、ペプチドZ（配列番号9）、ペプチドA（配列番号10）及びペプチドB（配列番号11）（それぞれ図4に示してある）を含む、請求の範囲第25項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

28. ペプチドY（配列番号8）、ペプチドZ（配列番号9）及びペプチドX（配列番号7）（それぞれ図4に示してある）を逐次の順序で含む、単離したレコンビトープペプチドYZX。

29. ペプチドA（配列番号10）、ペプチドY（配列番号8）、ペプチドZ（配列番号9）、ペプチドX（配

列番号7）及びペプチドB（配列番号11）（それぞれ図4に示してある）を逐次の順序で含む、単離したレコンビトープペプチドAYZXB。

30. 少なくとも2つの前記の領域の間に挿入された蛋白質加水分解部位を含む、請求の範囲第1項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

31. 領域がそれぞれ蛋白質アレルギーの少なくとも2つのT細胞エピトープを含む、請求の範囲第1項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

32. Felis 属の蛋白質アレルギーの単離したペプチドであって、該ペプチドが該蛋白質アレルギーの少なくとも1つのT細胞エピトープを含み、該ペプチドが、図4に示すようなペプチドA（配列番号10）及びペプチドB（配列番号11）のアミノ酸配列からなる群より選択するアミノ酸配列を含む、上記の単離したペプチド。

33. 請求の範囲1のレコンビトープペプチドをコードする核酸配列又は該核酸配列の機能の同等物。

34. 請求の範囲5のレコンビトープペプチドをコードする核酸配列又は該核酸配列の機能の同等物。

35. 同じ又は異なる蛋白質抗原に由来する少なくとも2つの領域を含む単離したレコンビトープペプチドであって、該レコンビトープペプチドがヒトT細胞刺激性を有する、上記の単離したレコンビトープペプチド。

36. 蛋白質抗原が蛋白質アレルギーを含む、請求の範囲第35項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

37. 少なくとも3つの領域を含む、請求の範囲第35項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

38. 領域を、蛋白質抗原における領域の天然の構成と異なる構成で配置した、請求の範囲第35項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

39. 領域が同じ蛋白質抗原に由来する、請求の範囲第38項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

40. 領域が同じ蛋白質抗原に由来し、それらの領域を非隣接の構成で配置した、請求の範囲第35項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

41. 非隣接的領域をアミノ酸により規定し、それらの領域が由来する蛋白質抗原が、アミノ末端からカルボキシル末端まで逐次の順序で配置したアミノ酸を含み、且つレコンビトープペプチドの当該非隣接的領域を非逐次の順序で配置する、請求の範囲第40項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

42. 請求の範囲第1項に記載のレコンビトープペプチド及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む治療用組成物。

43. 請求の範囲第5項に記載のレコンビトープペプチド及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む治療用組成物。

44. 請求の範囲第7項に記載のレコンビトープペプチド及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む治療用組成物。

45. 治療上有効な量の請求の範囲第42項に記載の組成物を個人に投与することを含む、個人における蛋白質アレルギーに対する感受性を治療する方法。

46. 治療上有効な量で請求の範囲第42項に記載の2種の異なる組成物を逐次的に個人に投与することを含む、個人における蛋白質アレルギーに対する感受性を治療する方法。

47. 治療上有効な量の請求の範囲第43項に記載の組成物を個人に投与することを含む、個人における蛋白質アレルギーに対する感受性を治療する方法。

48. 請求の範囲第35項に記載のレコンビトープペプチド及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む治療用組成物。

49. 請求の範囲第36項に記載のレコンビトープペプチド及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む治療用組成物。

50. 請求の範囲第40項に記載のレコンビトープペプチド及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む治療用組成物。

51. 治療上有効な量の請求の範囲第48項に記載の組成物を個人に投与することを含む、個人における蛋白質アレルギーに対する感受性を治療する方法。

52. 治療上有効な量の請求の範囲第49項に記載の組成物を個人に投与することを含む、個人における蛋白質アレルギーに対する感受性を治療する方法。

53. 個人における少なくとも1つの蛋白質アレルギーに対する特定の遅延型過敏症を検出する方法であって、少なくとも1つの該蛋白質アレルギーの改変型若しくはその一部、又は組換えにより生成した少なくとも1つの該蛋白質アレルギー、又は少なくとも1つの該蛋白質アレルギーに由来する少なくとも2つの領域を含むレコンビトープペプチド（各々はヒトT細胞刺激活性を有し且つ該少なくとも1つの蛋白質アレルギーに特異的な免疫グロブリンEに結合しないか、もしレコンビトープの該免疫グロブリンEへの結合が起きたとしても、かかる結合は当該少なくとも1つの蛋白質アレルギーに感受性の個人のかかなりのパーセンテージにおいてマスト細胞若しくは好塩基球からの媒介物質の放出を生じない）を用いる遅延型過敏症試験を個人に施し、そして特定の遅延型過敏症反応がその個人において起きる程度を測定することを含む、上記の方法。

54. 領域がそれぞれ、前記の少なくとも1つの蛋白質アレルギーの少なくとも1つのT細胞エピトープを含む、請求の範囲第53項に記載の方法。

55. 個人において、少なくとも1つの蛋白質アレルギーに特異的な免疫グロブリンEの存在並びにそれらの個人のT細胞が当該少なくとも1つの蛋白質アレルギーのT細胞エピトープに反応する能力を測定する方法であって、下記の工程を含む当該方法：

a) それらの個人に、当該少なくとも1つの蛋白質ア

方法。

57. 個人において、少なくとも1つの蛋白質アレルギーに対する感受性を検出し及び治療する方法であって、下記の工程を含む当該方法：

a) それらの個人に、当該少なくとも1つの蛋白質アレルギー若しくはその一部、又は当該少なくとも1つの蛋白質アレルギーの改変型若しくはその一部（各々は、当該少なくとも1つの蛋白質アレルギーに特異的な免疫グロブリンEに結合する）を用いる即時型過敏症試験を施し、

b) 特異的な即時型過敏症反応が起きるか否かを測定し、

c) 特定の即時型過敏症反応を有する個人に、当該少なくとも1つの蛋白質アレルギーの改変型若しくはその一部、又は当該少なくとも1つの組換えにより生成した蛋白質アレルギー、又は当該少なくとも1つの蛋白質アレルギーに由来する少なくとも2つの領域を含むレコンビトープペプチド（各々は、当該少なくとも1つの蛋白質アレルギーに特異的な免疫グロブリンEに結合せず、或は、もし当該免疫グロブリンEへの結合が起きたとしても、かかる結合はマスト細胞若しくは好塩基球からの媒介物質の放出を生じない）を用いる遅延型過敏症試験を施し、

d) 特異的な遅延型過敏症反応が起きるか否かを測定し、そして

アレルギー若しくはその一部、又は当該少なくとも1つの蛋白質アレルギーの改変型若しくはその一部（各々は、当該少なくとも1つの蛋白質アレルギーに特異的な免疫グロブリンEに結合する）を用いる即時型過敏症試験を施し、

b) 特定の即時型過敏症反応が起きたか否かを測定し、

c) 工程a)における即時型過敏症試験を施す前に、施すと同時に、若しくは施した後に、当該少なくとも1つの蛋白質アレルギーの改変型若しくはその一部、又は当該少なくとも1つの組換えにより生成した蛋白質アレルギー、又は当該少なくとも1つの蛋白質アレルギーに由来する少なくとも2つの領域を含むレコンビトープペプチド（各々は、ヒトT細胞刺激活性を有し且つ当該少なくとも1つの蛋白質アレルギーに特異的な免疫グロブリンEに結合しないか、もし当該免疫グロブリンEへの結合が起きたとしても、かかる結合は、当該少なくとも1つの蛋白質アレルギーに感受性の個人のかかなりのパーセンテージにおいてマスト細胞若しくは好塩基球からの媒介物質の放出を生じない）を用いる遅延型過敏症試験を個人に施し、そして

d) 特定の遅延型過敏症が起きるか否かを測定する。

58. レコンビトープペプチドの領域がそれぞれ前記の少なくとも1つの蛋白質アレルギーの少なくとも1つのT細胞エピトープを含む、請求の範囲第55項に記載の

e) 特定の即時型過敏症反応と特定の遅延型過敏症反応とを有する個人に、工程c)の当該少なくとも1つの蛋白質アレルギー若しくは当該その一部、又は工程c)の当該組換えにより生成した蛋白質アレルギー、又は工程c)の当該レコンビトープペプチド、並びに製薬上許容し得るキャリアー若しくは特釈物を含む治療上有効な量の治療用組成物を投与する。

58. レコンビトープペプチドの領域がそれぞれ前記の少なくとも1つの蛋白質アレルギーの少なくとも1つのT細胞エピトープを含む、請求の範囲第57項に記載の方法。

59. 下記の工程を含む、請求の範囲第35項に記載のレコンビトープペプチドをデザインする方法：

a) 公知の抗原の蛋白質構造を検討し、

b) その抗原を理論的に少なくとも2つの所望の長さのペプチド領域に分割し、

c) 当該少なくとも2つのペプチド領域を理論的に配置してペプチド領域が非隣接的順序で再配置された少なくとも1つのレコンビトープペプチドを形成し、

d) 工程c)の少なくとも1つのレコンビトープペプチドの構成を有する少なくとも1つのレコンビトープペプチドを生成し、

e) 工程d)の少なくとも1つのレコンビトープペプチドがヒトT細胞刺激活性を有するか否かを測定する。

60. 更に、下記の工程を含む、請求の範囲第58項に

記載の方法:

1) 工程 e) においてヒト T 細胞刺激活性を有することが見出されたレコンビトープペプチドが、工程 a) の抗原に特異的な免疫グロブリン E に結合するか否かを測定する。

61. 工程 b) において、抗原を所望の長さの重複領域に分割する。請求の範囲第 59 項に記載の方法。

62. 抗原の少なくとも 1 つの T 細胞エピトープ又はヒト T 細胞刺激活性を有する抗原の少なくとも 1 つの領域が公知であり、工程 b) においてヒト T 細胞刺激活性を有する当該領域又は当該 T 細胞エピトープを当該ペプチド領域の少なくとも 1 つとして利用する。請求の範囲第 59 項に記載の方法。

63. 工程 b) において、抗原をアルゴリズムに従って領域に分割する。請求の範囲第 59 項に記載の方法。

64. 蛋白質抗原が蛋白質アレルゲンを含み、工程 b) が更に、当該ペプチド領域を生成すること並びに当該ペプチド領域が工程 a) のアレルゲンに特異的な免疫グロブリン E に結合するか否か及びかかるペプチド領域が Ig E に結合する場合にかかる結合がマスト細胞若しくは好塩基球からの媒介物質の放出を引き起こすか否かを測定することを含み、そして、工程 c) において、工程 a) のアレルゲンに特異的な免疫グロブリン E に結合してマスト細胞若しくは好塩基球からの媒介物質の放出を引き起こすペプチド領域が、少なくとも 1 つのレコン

ビトープペプチドを形成するように配置されたペプチド領域に含まれない。請求の範囲第 59 項に記載の方法。

65. 同じ若しくは異なる蛋白質抗原に由来する少なくとも 2 つの T 細胞エピトープを含む、単離したレコンビトープペプチド。

66. 少なくとも 3 つの T 細胞エピトープを含む、請求の範囲第 65 項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

67. 個人における、蛋白質抗原に対する感受性を治療する方法であって、その個人に少なくとも 2 種の異なる単離したレコンビトープペプチド (各レコンビトープペプチドは、同じ又は異なる蛋白質抗原に由来する少なくとも 2 つのヒト T 細胞エピトープを含む) を治療上有効な量で逐次的に投与することを含む、上記の方法。

68. 個人における、*Feline domesticus* に対する感受性を治療する方法であって、その個人に、ペプチド X (配列番号 7)、ペプチド Y (配列番号 8)、ペプチド Z (配列番号 9)、ペプチド A (配列番号 10)、ペプチド B (配列番号 11) 及びペプチド C (配列番号 77) (それぞれ図 4 に示してある) からなる群より選択する少なくとも 2 つの異なるペプチドを治療上有効な量で逐次的に投与することを含む、上記の方法。

69. 少なくとも 2 つの単離したレコンビトープペプチドを含む組成物であって、当該レコンビトープペプチドがそれぞれ同じ若しくは異なる蛋白質抗原に由来する

少なくとも 2 つの T 細胞エピトープを含む、上記の組成物。

70. 少なくとも 2 つの単離したレコンビトープペプチドを含む組成物であって、当該レコンビトープペプチドがそれぞれ少なくとも 2 つの領域を含み、それぞれはヒト T 細胞刺激活性を有し、当該領域はそれぞれ少なくとも 1 つの蛋白質抗原の T 細胞エピトープを含み、当該領域は同じ又は異なる蛋白質抗原に由来する、上記の組成物。

71. 少なくとも 2 つの単離したレコンビトープペプチドを含む組成物であって、当該レコンビトープペプチドがそれぞれ、同じ又は異なる蛋白質抗原に由来する少なくとも 2 つの領域を含み、当該レコンビトープペプチドがそれぞれヒト T 細胞刺激活性を有する、上記の組成物。

72. 各々ヒト T 細胞刺激活性を有する少なくとも 2 つの領域を含み、該領域がそれぞれ蛋白質抗原の少なくとも 1 つの T 細胞エピトープを含む単離したレコンビトープペプチド。

73. 蛋白質抗原が自己抗原である。請求の範囲第 72 項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

74. 自己抗原を、インシュリン、ミエリン増基性細胞、 α h 因子、アセチルコリン受容体、甲状腺細胞受容体、基底膜蛋白質、甲状腺蛋白質、PM-1、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (64 K) 及びカルボ

キシペプチダーゼ H からなる群より選択する。請求の範囲第 73 項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

75. 領域を蛋白質抗原におけるそれらの領域の天然の構成と異なる構成で配置した、請求の範囲第 72 項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

76. 領域を非隣接的構成で配置した、請求の範囲第 72 項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

77. 非隣接的領域をアミノ酸で規定し、それらの領域が由来する蛋白質抗原がアミノ末端からカルボキシ末端まで逐次的順序で配置されたアミノ酸を含み、且つレコンビトープペプチドの当該非隣接的領域を非逐次的順序で配置した、請求の範囲第 76 項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

78. 前記の蛋白質抗原に感受性の個人のかかりのパーセンテージにおいて当該蛋白質抗原に特異的な免疫グロブリンに結合しない。請求の範囲第 72 項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

79. 領域を蛋白質抗原におけるそれらの領域の天然の構成と異なる構成で配置した、請求の範囲第 73 項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

80. 領域を非隣接的構成で配置した、請求の範囲第 73 項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

81. 非隣接的領域をアミノ酸で規定し、それらの領域が由来した蛋白質領域がアミノ末端からカルボキシ末端まで逐次的順序で配置されたアミノ酸を含み、且つレコ

ンビトープペプチドの当該非隣接的領域を非逐次的順序で配置した、請求の範囲第80項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

82. 前記の蛋白質抗原に感受性の個人のかかなりのパーセンテージにおいて前記の自己抗原に特異的な免疫グロブリンに結合しない、請求の範囲第73項に記載の単離したレコンビトープペプチド。

83. 請求の範囲第72項に記載のレコンビトープペプチドをコードする核酸配列又は当該核酸配列の機能的同物。

84. 請求の範囲第78項に記載のレコンビトープペプチド及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む治療用組成物。

85. 請求の範囲第78項に記載のレコンビトープペプチド及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む治療用組成物。

86. 請求の範囲第80項に記載のレコンビトープペプチド及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む治療用組成物。

87. 請求の範囲第82項に記載のレコンビトープペプチド及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む治療用組成物。

88. 個人における蛋白質抗原に対する感受性を治療する方法であって、その個人に請求の範囲第84項に記載の2種の異なる組成物を治療上有効な量で逐次的に投与

することを含む、上記の方法。

89. 個人における蛋白質抗原に対する感受性を治療する方法であって、その個人に請求の範囲第87項に記載の2種の異なる組成物を治療上有効な量で逐次的に投与することを含む、上記の方法。

90. 少なくとも2種の単離したレコンビトープペプチドを含む組成物であって、当該レコンビトープペプチドが、それぞれヒトT細胞刺激活性を有する少なくとも2つの領域をそれぞれ含み、当該領域がそれぞれ蛋白質抗原の少なくとも1つのT細胞エピトープを含む、上記の組成物。

91. 個人において、蛋白質抗原に特異的な免疫グロブリンの存在並びにそれらの個人のT細胞の当該蛋白質抗原のT細胞エピトープに応答する能力を測定する方法であって、下記の工程を含む当該方法：

a) 個人から得た第1の血液試料若しくは第1の血液試料の少なくとも一部を、当該蛋白質抗原若しくはその一部又は当該蛋白質抗原の改変型若しくはその一部（各々は、当該蛋白質抗原に特異的な免疫グロブリンと、血液成分の当該蛋白質抗原、改変した蛋白質抗原又は当該抗原の何れかの一部との結合に適した条件下で結合する）と合わせ、

b) 結合が起きるか否かを測定し、

c) 工程b)において血液成分の結合を有することが見出された個人から得た第2の血液試料又は当該第1の

血液試料の第2の部分を、当該蛋白質抗原に由来する少なくとも2つの領域を含むレコンビトープペプチド（当該レコンビトープペプチドは、当該蛋白質抗原に対するヒトT細胞刺激活性を有し且つその抗原に感受性の個人の集団のかかなりのパーセンテージにおいて当該蛋白質抗原に特異的な免疫グロブリンに結合しない）と合わせ、そして

d) T細胞刺激が起きたか否かを測定する。

92. 下記の工程を含む、個人における蛋白質抗原に対する感受性を検出し及び治療する方法：

a) その個人から得た第1の血液試料又は第1の血液試料の少なくとも一部を当該蛋白質抗原若しくはその一部、又は当該蛋白質抗原の改変型若しくはその一部（各々は、血液成分の当該蛋白質抗原、改変した蛋白質抗原又は当該抗原の何れかの部分との結合に適した条件下で当該蛋白質抗原に特異的な免疫グロブリンと結合する）と合わせ、

b) 結合が起きたか否かを測定し、

c) 工程b)において血液成分の結合が見出された個人から得た第2の血液試料又は当該第1の血液試料の第2の部分を、当該蛋白質抗原の改変型若しくはその部分、又は組換えにより生成した当該蛋白質抗原、又は当該蛋白質抗原に由来する少なくとも2つの領域を含むレコンビトープペプチド（各々は、当該蛋白質抗原に対するヒトT細胞刺激活性を有し且つその抗原に感受性の個

人の集団のかかなりのパーセンテージにおいて当該蛋白質抗原に特異的な免疫グロブリンと結合しない）と合わせ、

d) T細胞刺激が起きたか否かを測定し、そして

e) 工程b)における結合及び工程d)におけるT細胞刺激を有することが見出された個人に、工程c)の当該蛋白質抗原若しくはその一部の改変型、又は工程c)の当該組換えにより生成した蛋白質抗原、又は工程c)の当該レコンビトープペプチド並びに製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む治療上有効な量の治療用組成物を投与する。

93. 個人における、少なくとも1つの蛋白質抗原に対する遅延型過敏症を検出する方法であって、その個人に当該少なくとも1つの蛋白質抗原若しくはその一部、又は当該少なくとも1つの組換えにより生成した蛋白質抗原、又は当該少なくとも1つの蛋白質抗原に由来する少なくとも2つの領域を含むレコンビトープペプチド（各々は、ヒトT細胞刺激活性を有し且つ当該少なくとも1つの蛋白質抗原に感受性の個人の集団のかかなりのパーセンテージにおいて当該少なくとも1つの蛋白質抗原に特異的な免疫グロブリンに結合しない）を用いる遅延型過敏症試験を施し、そしてその個人において特定の遅延型過敏症反応が起きる程度を測定することを含む、上記の方法。

94. 個人において、*Felis domesticus*に対する感受性

を治療する方法であって、その個人に、ペプチドX（配列番号7）、ペプチドY（配列番号8）、ペプチドZ（配列番号9）、ペプチドA（配列番号10）、ペプチドB（配列番号11）及びペプチドC（配列番号12）（各々は図4に示してある）からなる群より選択する少なくとも2種の異なるペプチドを治療上有効な量で同時に投与することを含む上記の方法。

95. 少なくとも2種の単離したペプチドを含む組成物であって、当該ペプチドを、ペプチドX（配列番号7）、ペプチドY（配列番号8）、ペプチドZ（配列番号9）、ペプチドA（配列番号10）、ペプチドB（配列番号11）及びペプチドC（配列番号12）（各々は図4に示してある）からなる群より選択する、上記の組成物。

96. 前記の2種の単離したペプチドが、ペプチドX（配列番号7）及びペプチドY（配列番号8）を含む、請求の範囲第9項に記載の組成物。

97. 領域を、ヒトMBPのアミノ酸残基84～106の全部若しくは一部を含むペプチド、ヒトMBPのアミノ酸残基84～102の全部若しくは一部を含むペプチド、ヒトMBPのアミノ酸残基89～101の全部若しくは一部を含むペプチド、ヒトMBPのアミノ酸残基140～172の全部若しくは一部を含むペプチド及びヒトMBPのアミノ酸残基143～168の全部若しくは一部を含むペプチドからなる群より選択する、請求の

範囲第1項に記載の単離したレコンビトープペプチド。
98. 少なくとも2種の単離したペプチドを含む組成物であって、当該ペプチドを、ヒトMBPのアミノ酸残基84～106の全部若しくは一部を含むペプチド、ヒトMBPのアミノ酸残基84～102の全部若しくは一部を含むペプチド、ヒトMBPのアミノ酸残基89～101の全部若しくは一部を含むペプチド、ヒトMBPのアミノ酸残基140～172の全部若しくは一部を含むペプチド及びヒトMBPのアミノ酸残基143～168の全部若しくは一部を含むペプチドからなる群より選択する、上記の組成物。

99. 個人において、多発性硬化症を治療する方法であって、その個人に、ヒトMBPのアミノ酸残基84～102の全部若しくは一部を含むペプチド、ヒトMBPのアミノ酸残基89～101の全部若しくは一部を含むペプチド、ヒトMBPのアミノ酸残基140～170の全部若しくは一部を含むペプチド、ヒトMBPのアミノ酸残基143～168の全部若しくは一部を含むペプチド及びヒトMBPのアミノ酸残基145～163の全部若しくは一部を含むペプチドからなる群より選択する少なくとも2種のペプチドを投与することを含む、上記の方法。

明 細 書

レコンビトープペプチド

発明の背景

Tリンパ球は、免疫応答の特異的及び非特異的なエフェクター機構の両者を媒介し且つ調節することが出来る。CD4+Tリンパ球は、抗体産生を助け、他のT細胞の成長並びに他の免疫細胞例えば単核細胞及び顆粒球等の成長及び分化を調節するサイトカインを分泌する。機能的及び生化学的研究は、細胞性免疫応答の誘発が、抗原提示アクセサリ細胞上で発現されている主要組織適合遺伝子複合体（MHC）生成物と結合した外来蛋白質のペプチド断片を認識するT細胞上の抗原レセプターに依存することを示した。最近の技術における進歩は、抗原特異的なヒト及びマウス細胞系統並びにクローンイン・ビトロで効率よく培養することを可能にした。更に、今や、多量の蛋白質抗原若しくはそれらの断片を組換えDNA技術又は固相ペプチド合成を用いて生産することが可能である。こうして、過去数年間に、幾つかの研究グループが、MHCと結合してT細胞により認識される抗原蛋白質の直鎖状アミノ酸配列（T細胞エピトープ）を決定することを始めた。

細菌性及びウイルス性の病原体、自己抗原、アレルゲン並びに他の実験用抗原例えば鶏島卵リソチーム（HE

L）、オバルブミン（OVA）及びラムグリブレッサー（c1）を含む種々の蛋白質抗原から誘導されたペプチドが、抗原特異的T細胞を刺激する能力について試験された。ペプチドの広いサイズスペクトルがT細胞エピトープとして作用することが報告された。例えば、OVAのアミノ酸残基324～339（Shisonkevitz, R等、*J. Immunol.*, 133:2167(1984)）、HELのアミノ酸残基74～96（Shantri, N.等、*J. Exp. Med.*, 164:882-896(1986)）、及びラムグリブレッサー（c1）のアミノ酸残基12～26（Lal, M.等、*J. Immunol.*, 139:3973-3980(1987)）は、全蛋白質活性化したT細胞を効率的に引き起こすことが示された。B型肝炎表面抗原から誘導したペプチド（HBsAgアミノ酸残基19～33）は、最近、組換えB型肝炎ワクチンで免疫されたヒト患者の大多數においてT細胞応答を刺激することが示された（Schad, V.C.等、*Seminars in Immunol.*, 3:217-224(1991)）。主要マイコバクテリウム抗原65kD蛋白質も又エピトープマップされた（Laab, J.R.等、*EMBOJ.*, 6(5):1245-1249(1987)）。T細胞エピトープは、65kD蛋白質のアミノ酸残基112～132及び437～459からなるペプチド中に同定された。ミエリン塩基性蛋白質（MBP）、実験的自己免疫脳脊髄炎（EAE）を誘発する自己抗原及び多発性硬化症（MS）における推定抗原も又、ヒト（Ota等、*Nature*, 346:183-187(1990)）及びげっ歯動物（Zanvil

等、Nature 324:258-260(1986)) 両系においてエピトープマップされた。Ota等は、MS患者により認識される主要T細胞エピトープを、MBPアミノ酸残基84～102と同定した。MS患者からのT細胞により認識される少数エピトープ(MBPアミノ酸残基143～168、61～82、124～42及び31～50)も又記載された。Zamvil等は、MBPアミノ酸残基1～11が、感受性のグッド動物系統にEAEを引き起こす主要T細胞エピトープを含むことを示した。

アレルギー性蛋白質中に存在するT細胞エピトープが、つい最近記載された(O'Hehir, R等、Ann. Rev. Immunol., 9:67-95(1991))。室内塵ダニアレルゲンDer p Iから誘導された幾つかのペプチドは、T細胞反応性であることが示された(Thomas, W.R.等 Epitopes of Atopic Allergens Proceedings of Workshop from XIV Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Berlin (1989年 9月) 77-82頁; O'Hehir, R.E. Annual Review Immunology 9: 67-95(1991); Stewart, G.A.等 Epitopes of Atopic Allergens Proceedings of Workshop from XIV Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Berlin (1989年 9月) 41-47頁; 及び Yssel, H.等 T Cell Activation in Health and Disease中: Discrimination Between Immunity and Tolerance, Conference 22-26(1990年 9月) 英国

Oxford, Trinity College)。短ブクサアレルゲンAnha Iアミノ酸残基54～65から誘導されたT細胞刺激性ペプチドも又報告された(Rothbard, J.B.等、Cell, 52:515-523(1988))。ライ麦アレルギーの個人から得たT細胞クローンのパネルを用いて、Perez等は、T細胞エピトープが蛋白質アレルギー Gal p Iのアミノ酸残基191～210内に含まれることを示した(Perez, M.等 J. Biol. Chem., 265(27):16210-16215(1990))。

発明の要約

本発明は、T細胞刺激活性を有する単離されたペプチド(レコンビトープ(商標)と呼ぶ)を提供する。この発明のレコンビトープペプチドは、好ましくは、ヒトT細胞刺激活性を有する。更に、この発明のレコンビトープペプチドは、好ましくは、同じ又は異なる蛋白質抗原から誘導される少なくとも2つのT細胞エピトープを含み、一層好ましくは、蛋白質抗原に由来する少なくとも1つのT細胞エピトープをそれぞれ含む少なくとも2つの領域を含む(各領域は好ましくはヒトT細胞刺激活性を有する)。幾つかの場合には、レコンビトープペプチドは、同じ又は異なる蛋白質抗原に由来する3つのかかる領域を含む。ここで用いる場合、レコンビトープペプチドの領域は、少なくとも5アミノ酸残基、好ましくは7アミノ酸残基を含む。典型的には、レコンビトープペ

プチドは、1次構造依存性のヒトT細胞刺激活性を維持するときに蛋白質抗原の2次及び3次構造と関係する望ましくない特性を除くために、天然の蛋白質抗原中の領域の構成と異なる構成に配置された領域を含む。例えば、これらの領域を同じ蛋白質抗原から誘導し、非隣接的構成に配置し或は非隣接的構成且つ非逐次的順序で配置することが出来る。

この発明のレコンビトープペプチドは、蛋白質アレルギーから誘導することが出来る。これらのレコンビトープペプチドは、好ましくは、最小免疫グロブリンE刺激活性しか有さず且つ、レコンビトープが由来する蛋白質アレルギーが免疫グロブリンEに結合するより実質的に低い程度にしか免疫グロブリンEに結合しない。一層好ましくは、蛋白質アレルギーに由来するレコンビトープペプチドは、蛋白質アレルギーに感受性の個人のかかりのパーセンテージ(少なくとも約75%)において蛋白質アレルギーに特異的な免疫グロブリンEに結合しないか、又はかかる結合が起きてもかかる結合はマスト細胞若しくは好塩基球からの媒介物質、例えばヒスタミン、の放出を生じない。更に、レコンビトープペプチドは、自己抗原、例えば、インシュリン、ミエリン塩基性蛋白質及びアセチルコリン受容体から誘導することが出来る。これらのレコンビトープペプチドは、好ましくは、自己抗原に感受性の個人の集団のかかりのパーセンテージ(少なくとも約75%)において自己抗原に特異

的な免疫グロブリンと結合しない。更に、蛋白質アレルギー又は他の蛋白質抗原から誘導したレコンビトープペプチドを、天然の蛋白質の望ましくない特性(例えば、酵素活性)を治療目的のために排除し得るようにデザインすることが出来る。

この発明は又、個人における蛋白質アレルギー若しくは他の蛋白質抗原に対する感受性を診断する方法、かかる感受性を治療する方法及び、1種以上のレコンビトープペプチドを含む治療用組成物をも提供する。例えば、個人における少なくとも1種の蛋白質アレルギー又は他の蛋白質抗原に対する特定の遅延型過敏症及び/又は特定の即時型過敏症を検出する方法を開示する。1つの方法によって、この発明のレコンビトープペプチドを用いて特定の遅延型過敏症の試験を個人に施すことが出来る。且つ特定の遅延型過敏症反応が個人において起きる程度を測定することが出来る。他の方法において、少なくとも1つの蛋白質アレルギーに特異的な免疫グロブリンEの存在を個人において測定することが出来る。その個人のT細胞が蛋白質アレルギーのT細胞エピトープに応答する能力を評価することが出来る。この実施態様において、蛋白質アレルギー若しくはその一部又は蛋白質アレルギー若しくはその一部の改変型(各々は、蛋白質アレルギーに特異的な免疫グロブリンEに結合する)を用いる特定の即時型過敏症の試験を個人に施す。更に、蛋白質アレルギー若しくはその一部の修飾型又は組換えによ

り製造した蛋白質アレルギー又は蛋白質アレルギーから誘導したレコンビトープペプチド(各々は、ヒトT細胞刺激活性を有し、蛋白質アレルギーに特異的な免疫グロブリンE(IgE)に結合せず、もし結合がおきても、かかる結合は、アレルギーに感受性の個人の集団のかなりのパーセンテージ(例えば、少なくとも約75%)においてマスト細胞又は好塩基球からの媒介物質の放出を生じない)を用いる特定の遅延型過敏症の試験を、即時型過敏症試験を施す前に、同時に、又は施した後に、その同じ個人に施す。特定の即時型過敏症反応及び特定の遅延型過敏症反応の両方を示す個人には、蛋白質アレルギーに対する感受性を低下させると考えられるので、治療上有効量の改変型の蛋白質アレルギー若しくはその部分、組換えにより製造した蛋白質アレルギー又は蛋白質アレルギーから誘導したレコンビトープペプチド及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む治療用組成物を投与する。

蛋白質抗原から誘導したT細胞刺激活性を有するレコンビトープペプチドは又、個人における蛋白質抗原に特異的な免疫グロブリンの存在及びそれらの個人のT細胞の蛋白質抗原のT細胞エпитープにより刺激される能力を測定する他の方法においても使用することが出来る。1つのかかる方法は、個人から得た第1の血液試料又はその試料の少なくとも一部を、蛋白質抗原、改変型の蛋白質抗原、又は何れかの一部(各々は、蛋白質抗原に特

異的な免疫グロブリンに結合する)と合わせることを含む。試料及び抗原を、試料若しくはその一部分中の血液成分例えば免疫グロブリンの結合に適した条件下で、蛋白質抗原、改変した蛋白質抗原又はこれらの抗原の何れかの部分と合わせる。もし結合が起きたら、T細胞刺激が起きたか否かを測定するために、個人から得た第2の血液試料又は元の試料の第2の部分、蛋白質抗原、蛋白質抗原の改変型又はその一部から誘導した少なくとも2つの領域を含むレコンビトープペプチド又は組換えにより製造した蛋白質抗原(各々は、T細胞刺激活性を有し、好ましくは、抗原に感受性の個人の集団かなりのパーセンテージ(例えば、少なくとも約75%)において蛋白質抗原に特異的な免疫グロブリンに結合しない)と合わせる。もしT細胞刺激が起きたら、好ましくは、蛋白質抗原に対する感受性を低下させると考えられるので、その個人に、改変型の蛋白質抗原若しくはその一部、組換えにより製造した蛋白質抗原又はレコンビトープペプチド及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む治療上有効量の治療用組成物を投与する。

個人が感受性である蛋白質抗原が、未知若しくは不明確なエпитープを有するこの発明のレコンビトープペプチドをデザインする方法も又提供する(例えば、蛋白質抗原に対するヒトT細胞刺激活性を有する蛋白質抗原の幾つかの若しくはすべてのペプチド領域が、標準T細胞生物学技術(例えば Current Protocols in Immunology,

Coligan, J.E.等編、第1巻(1991))によって規定されておらず、或は、蛋白質抗原の正確なヒトT細胞エпитープはマッピング技術によって規定されていない)。1つの方法により、アレルギー又は他の蛋白質抗原の公知の蛋白質構造を検討し、そのアレルギー若しくは他の抗原を理論的に少なくとも2つの所望の長さのペプチド領域に分割する。理論的には、実際に行なうのではなく、例えば紙上若しくは頭の中での思考過程を意味する。この分割は、任意であってよく、アルゴリズムに従って行なうことが出来、或は、全部又は部分的にT細胞刺激活性を有することが公知の蛋白質抗原の領域に基づいてよい。T細胞刺激活性を有する蛋白質抗原の少しの領域のみが知られているとき又はヒトT細胞刺激活性を有する蛋白質抗原のすべての領域が未知であるとき、好ましくは50%以上、一層好ましくは全蛋白質を所望の長さのペプチド領域に分割する。これらのペプチド領域を、次いで、理論的に配置して少なくとも1つのレコンビトープペプチドを形成し、該ペプチド中においてこれらの領域は非隣接的狀態で再配置される。続いて、少なくとも1つの再配置した構成を有するレコンビトープペプチドを生成し、ヒトT細胞を刺激するレコンビトープペプチドの能力を測定する。更なる実施態様において、ヒトT細胞刺激活性を有することが見出されたレコンビトープペプチドの能力を試験して、アレルギー若しくは他の抗原に特異的な免疫グロブリンに結合するその能力

を測定し、又は他の望ましくない特性(例えば、プロテアーゼ活性)のないことを試験する。

図面の簡単な説明

図1は、リーダー配列A(配列番号1及び2)及びB(配列番号3及び4)を含むヒトT細胞反応性ネコ蛋白質(TRFP)の第1の核酸配列及び推定上のアミノ酸配列である。

図2は、リーダー配列(配列番号5及び6)を含むTRFPの第2の核酸配列及び推定上のアミノ酸配列である。

図3は、ネコアレルギーの患者から単離してアフィニティー精製したTRFPで活性化し、ラック付けしたペプチド応答の総計により分析した、T細胞の重複TRFPペプチドに対する応答を描いたグラフ表示である。

図4は、TRFPのペプチドX(配列番号7)、ペプチドY(配列番号8)、ペプチドZ(配列番号9)、ペプチドA(配列番号10)、ペプチドB(配列番号11)及びペプチドC(配列番号77)のアミノ酸配列であり、それぞれは少なくとも1つのTRFPのT細胞エпитープを含む。

図5は、複製連鎖反応(PCR)技術を用いるレコンビトープペプチドYZXの構築の図式表示である。

図6は、PCR技術を用いるレコンビトープペプチドAYZXBの構築の図式表示である。

図7は、レコンビトープペプチドYZXの構築で用いたオリゴヌクレオチドC（配列番号12及び13）、D（配列番号14及び15）、E（配列番号16及び17）、F（配列番号18及び19）、G（配列番号20及び21）、H（配列番号22及び23）及びI（配列番号24及び25）の並びにレコンビトープペプチドAYZXBの構築において用いたオリゴヌクレオチドJ（配列番号26及び27）、K（配列番号28及び29）、L（配列番号30及び31）、M（配列番号32及び33）、N（配列番号34及び35）及びO（配列番号36及び37）の核酸配列及び推定アミノ酸配列である。

図8は、核酸配列（大腸菌発現コドン使用）及びレコンビトープペプチドYZX（配列番号38及び39）を含む推定上のアミノ酸配列である。トロンピン開裂部位を示す

図9は、TRFPから単離したcDNAをテンプレートとして使用するPCR技術を用いるレコンビトープペプチドYZXの構築の図式表示である。

図10は、レコンビトープペプチドXZY（配列番号40～51）、YZZ（配列番号52～63）及びZXY（配列番号64～71）の構築で用いたプライマーの核酸配列及び推定アミノ酸配列である。

図11は、レコンビトープペプチドXZY、YZZ及びZXYを構築するために用いた個々のプライマーのア

ミノ酸配列の図解表示である。

図12は、不明確なT細胞エпитープであるホスホリパーゼA₂から誘導したレコンビトープペプチドの構築の図式表示である。

図13は、ネコアレルギーの個人から得られたヒトIgEの、レコンビトープペプチドXYZ、XZY、YZX、YZX、ZXY及びZXYを含む種々の蛋白質試料に対する結合を検出するSDS/PAGEウエスタンブロット分析の結果の表示である。

図14は、ネコアレルギーの個人から得たヒトIgEの、レコンビトープペプチドXYZ、XZY、YZX、YZX、ZXY及びZXYを含む種々の蛋白質試料に対する結合を示すELISA分析の結果のグラフ表示である。

図15a、15b及び15cは、3人の患者に由来するイン・ビトロでTRFP、レコンビトープペプチドYZX又はレコンビトープペプチドYZXに対して活性化され、種々のペプチドに対する応答を分析したT細胞システムの応答を描いたグラフ表示である。

図16は、レコンビトープペプチドYZXで免疫してイン・ビトロで応答を分析したマウスT細胞のレコンビトープペプチドYZXとの培養に対する応答を、IL-2産生により測定して描いたグラフ表示である。

発明の詳細な説明

本発明は、T細胞増殖の誘発、リンホカイン分泌及び/又はT細胞アレルギー寛容化等のT細胞刺激活性を有するレコンビトープペプチドという単離したペプチドに関する。この発明のレコンビトープは、好ましくは、ヒトT細胞刺激活性を有し、蛋白質アレルゲン、自己抗原又は他の蛋白質抗原に対する個人の感受性を診断し及び治療するのに有用である。一般に、この発明の範囲内の好適レコンビトープペプチドは、同じ又は異なる蛋白質アレルゲン又は他の蛋白質抗原に由来する少なくとも2つの領域を含み、各領域は、好ましくは、標準T細胞生物学技術により測定されるヒトT細胞刺激活性を有し、従って、少なくとも1つのT細胞エピトープを含む。例えば、微細マッピング技術により正確なT細胞エピトープを測定するために、標準T細胞生物学技術により規定した少なくとも1つのT細胞エピトープを含むペプチド領域は、ペプチド領域のアミノ若しくはカルボキシ末端の何れかにおけるアミノ酸残基の付加若しくは欠失により変更することが出来、改変ペプチドに対するT細胞反応性の変化を測定するために試験することが出来る。更に、もし重複領域を共有する2つ以上のペプチド領域が標準T細胞生物学技術により測定されるヒトT細胞刺激活性を有することが見出されるならば、かかるペプチド領域のすべて若しくは一部を含む更なるペプチドを生成することが出来、これらのペプチドを上記の微細マッピング手順によって試験することが出来る。微細マ

ッピングの結果として、T細胞認識に不可欠なアミノ酸残基を含む1組のヒトT細胞エピトープを生成することが出来る。

この発明のレコンビトープペプチドは、かかるレコンビトープペプチドをコードする核酸配列でトランスフォームした宿主細胞における組換えDNA技術により、又は化学合成により、又はある限定的状況においては蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原の化学的開裂によって製造することが出来る。組換え技術により製造する場合には、レコンビトープペプチドをコードする核酸でトランスフォームした宿主細胞を、その細胞に通した培養中で培養し、レコンビトープペプチドを、イオン交換クロマトグラフィー、等電点電気泳動、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動又は、レコンビトープペプチド、蛋白質アレルゲン若しくは他の抗原（これらからレコンビトープペプチドが誘導される）又はそれらの一部に特異的な抗体を用いる免疫的製法を含む当業者に公知のペプチド若しくは蛋白質精製のための技術を用いて、細胞培養培養地、宿主細胞又は両者から精製することが出来る。従って、この発明の1つの面は、レコンビトープペプチドをコードする核酸配列又は核酸配列の機能の同等物でトランスフォームした宿主細胞中で生成されたレコンビトープペプチドを提供する。この発明のレコンビトープペプチドを、レコンビトープペプチドが組換えDNA技術により生成されたときに實質的に細胞性物

質又は培養培地を含まないように、或は、化学合成したとき又は蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原の化学的開裂により得たときに化学的前駆体若しくは他の化学物質を實質的に含まないように単純する。

蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原の少なくとも2つのT細胞エピトープ又は少なくとも1つの領域（各領域は、少なくとも2つの蛋白質アレルゲン若しくは他の抗原のT細胞エピトープを含む）を含む本発明の好適レコンビトープペプチドを得るために、T細胞エピトープ又はT細胞エピトープを含む領域を、天然におけるアレルゲン若しくは抗原中のT細胞エピトープ若しくは領域の構成と異なる構成で配置する。例えば、T細胞エピトープ又はT細胞エピトープを含む領域を非隣接的構成で配置することが出来、好ましくは、同じ蛋白質アレルゲン若しくは他の抗原から導くことが出来る。非隣接的を、エピトープ又は領域が導かれる蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原に存在するアミノ酸配列の配置と異なるT細胞エピトープ若しくはT細胞エピトープを含む領域を含むアミノ酸の配置として定義する。更に、非隣接的なT細胞エピトープ又はT細胞エピトープを含む領域を非逐次的順序（例えば、アミノ酸がアミノ末端からカルボキシ末端へ配置されている天然の蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原（それらからT細胞エピトープ若しくはT細胞エピトープを含む領域が導かれる）のアミノ酸の順序と異なる順序）で配置すること

域に基づいてよい。

少なくとも1つのT細胞エピトープを含む蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原のほんの少しのペプチド領域しか公知でないか、ヒトT細胞刺激活性を有する蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原のすべての領域が未知であるときには、好ましくは蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原の全蛋白質配列の少なくとも50%、一層好ましくは蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原の全蛋白質配列を1つ以上のレコンビトープペプチドに分割し及び配置する。レコンビトープペプチドの形成におけるかかる大きいパーセンテージの蛋白質抗原の蛋白質配列の使用の目的は、その結果生じたレコンビトープペプチドが少なくとも15%、一層好ましくは少なくとも30%、更に好ましくは少なくとも50%及び最も好ましくは少なくとも100%の蛋白質抗原のT細胞エピトープを含むようにすることである。勿論、もし少なくとも1つのT細胞エピトープを含むことが知られた蛋白質抗原の僅かのペプチド領域しか蛋白質抗原のT細胞エピトープの上述のパーセンテージを構成せず、かかるペプチド領域が蛋白質抗原の全蛋白質配列の少なくとも50%を構成しないならば、レコンビトープペプチドの形成においてかかる大きいパーセンテージの全蛋白質配列を用いる必要はない。この方法によって、レコンビトープペプチドを、次いで、組換え又は合成によって生成することが出来、レコンビトープペプチドのヒトT

細胞が出来る。好適レコンビトープペプチドは、少なくとも15%、一層好ましくは少なくとも30%、更に好ましくは少なくとも50%及び最も好ましくは100%まで、蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原のT細胞エピトープを含む。

蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原のT細胞エピトープが未知若しくはは不確定な状況（例えば、ヒトT細胞刺激活性を有する蛋白質抗原の幾つか若しくはすべてのペプチド領域が標準T細胞生物学技術により規定されておらず、或は、蛋白質抗原の正確なヒトT細胞エピトープが微細マッピング技術により規定されていない）において、レコンビトープペプチドは、公知のアレルゲン若しくは他の抗体の蛋白質構造を検討してそのアレルゲン若しくは抗原を理論的に少なくとも2つの所望の長さのペプチド領域に分割することによって得ることが出来る。例えば、アレルゲン若しくは他の抗原の蛋白質配列を、少なくとも2つの重複しない所望の長さのペプチド領域又は少なくとも2つの重複する所望の長さのペプチド領域に系統的に分割し、及び、理論的に配置して、少なくとも2つの領域が非隣接的に好ましくは非逐次的順序で再配置された少なくとも1つのレコンビトープペプチドを形成することが出来る。このペプチド領域への分割は、任意であり、アルゴリズムに従って行なうことが出来、又はすべて若しくは部分的に少なくとも1つのT細胞エピトープを含むことの知られた蛋白質抗原の領

細胞を刺激する能力を測定することが出来る。レコンビトープペプチドが蛋白質アレルゲンから導かれた領域を含むときは、個々のペプチド領域を生成し、どの領域がアレルゲンに特異的な免疫グロブリンEに結合し及びかかる領域のどれがマスト細胞若しくは好塩基球からの媒介物質（例えば、ヒスタミン）の放出を引き起こすのかを測定するために試験することが出来る。試験したアレルギー性血清の約10~15%以上において免疫グロブリンEに結合し及びマスト細胞若しくは好塩基球からの媒介物質の放出を引き起こすことが見出されたこれらのペプチド領域は、好ましくは、レコンビトープペプチドを形成するために配列したペプチド領域に含まれない。

ホスホリパーゼA₂（ミツパチ毒由来の主要アレルゲン）から誘導されるレコンビトープの構築は、蛋白質抗原の蛋白質構造は公知であるがT細胞エピトープは未知若しくは不明確という場合のレコンビトープペプチドの構築の例証的実施例として用いることが出来る。ホスホリパーゼA₂は、cDNAクローニングにより明らかにされたように134アミノ酸からなる（Kuchler, K. 等 *Eur. J. Biochem.* 184:249-254）。このアミノ酸配列を領域に分割することが出来、それぞれは好ましくは20~35アミノ酸残基を含み、各領域は好ましくは約10アミノ酸だけ他と重複する（図12参照）。図12は領域に分割される蛋白質の全蛋白質配列を示しているが、少なくとも1つの組換えペプチドを形成するのに用いる

配列は、全蛋白質配列より実質的に少なくてもよい。構築したレコンビトープペプチド中にT細胞エピトープを含む可能性を最大にするために、アルゴリズムを用いて予想されるT細胞エピトープの存在を保持するように重複領域及び各領域の長さをデザインすることが出来る (Rothbard, J. 及び Taylor, W.R. EMBO J. 7:93-100 (1988); Berzofsky, J.A. Philos Trans R. Soc. Lond. 223:535-544 (1989))。好ましくは、公知のHLAクラスII特異的結合特異的アミノ酸残基を用いて、蛋白質アレルギー内のヒトT細胞エピトープが予想され得る。更に、構築されたレコンビトープペプチドがヒトアレルギー性IgEに結合する見込みを最小にするために、生成したレコンビトープペプチドのアミノ酸配列を、それらの領域をどこまでもし及び／又はアミノ末端領域若しくはカルボキシ末端領域を分子の反対の端に移すことによって、天然のホスホリパーゼA₂の構造と異なるようにすることが出来る (即ち、天然蛋白質のアミノ末端に位置するアミノ酸残基をレコンビトープペプチドのカルボキシ末端に位置させることが出来る)。同様の手順を用いて、蛋白質構造は公知であるが未知のT細胞エピトープを有する自己抗原例えばグルタミン酸デカルボキシラーゼ (例えば、Samson, J.P. 及び Wallat, J. Journal of Neurochemistry 54:703-705 (1990))、インシュリン (Joslin's Diabetes Mellitus, 第12版, 編者 A. Marble等, Lea 及び Pabiger, Philadelphia, 87 頁

(1985)) 等から導いたレコンビトープペプチドを構築することが出来る。この状況において、ペプチド領域を、自己抗原中の天然の領域の構成と異なる構成で配置して自己抗原の望ましくない特性例えば免疫グロブリン結合活性又は酵素活性を除去する。

アレルギー若しくは他の抗原から導いた少なくとも2つの領域を含むレコンビトープペプチドを試験してT細胞刺激活性 (即ち、増殖、リンホカイン分泌及び／又はT細胞アネルギー／寛容化の誘発) を有するレコンビトープペプチドを測定し、従って、該レコンビトープペプチドは少なくとも1つのT細胞エピトープを含む。例えば、ヒトT細胞刺激活性を、蛋白質アレルギー若しくは蛋白質抗原に感受性の個人 (即ち、その蛋白質アレルギー若しくは蛋白質抗原に対する免疫応答を有する個人) から得たT細胞を、その蛋白質アレルギー若しくは抗原から誘導したレコンビトープペプチドと共に培養し及びレコンビトープペプチドに反応するT細胞による増殖の存在を測定することによって試験することが出来る。実施例で詳細に説明するように、レコンビトープペプチドに対するT細胞による反応についての刺激指標は、増殖のコントロールC.P.Mで割ったレコンビトープペプチドに反応する最大C.P.Mとして計算することが出来る。この出願において用いる場合、ヒトT細胞刺激活性を、刺激指標少なくとも2.0として規定する。刺激指標少なくとも2.0は、免疫治療利として有用なレコンビト

ープペプチドを規定する目的について決定的であると考えられる。好適レコンビトープペプチドは、少なくとも2.5の、一層好ましくは少なくとも3.5の、最も好ましくは少なくとも5.0の刺激指標を有する。

更に、蛋白質アレルギーから導いたこの発明の好適レコンビトープペプチドは、免疫グロブリンE (IgE) に結合せず又は実質的に、これらのペプチドが導かれた蛋白質アレルギーがIgEに結合するより低い程度に結合する。標準的免疫療法は、全身性の反応例えばアナフィラキシーである。免疫グロブリンEは、マスト細胞若しくは好塩基球における結合及び抗体のIgEへの吸着及び媒介物質 (例えば、ヒスタミン、セロニン、好酸球定化因子) の放出から生じたアナフィラキシー反応の媒介物質である。従って、アナフィラキシーは、IgEに結合せず又はもし結合するにしてもかかる結合がマスト細胞若しくは好塩基球からの媒介物質 (例えば、ヒスタミン等) の放出を生じないレコンビトープペプチドの利用によって回避することが出来るであろう。更に、最小IgE刺激活性を有するレコンビトープペプチドは、特に、治療効果について好ましい。最小IgE刺激活性とは、全蛋白質アレルギーにより刺激されたIgE生産量及び／又はIL-4生産より少ないIgE生産をいう。

蛋白質アレルギーから導かれたこの発明のレコンビトープペプチドは、蛋白質アレルギーに感受性の個人に投

与したときに、そのアレルギーに対する個人のアレルギー性応答を緩和することが出来る。特に、蛋白質アレルギーの少なくとも2つのT細胞エピトープ若しくは蛋白質アレルギーから導いた少なくとも2つの領域 (各領域は、好ましくは、少なくとも1つのT細胞エピトープを含む) を含むレコンビトープペプチドは、そのアレルギーに感受性の個人に投与したときに、そのアレルギーに対する個人のT細胞応答を緩和することが出来る。ここで用いる場合、蛋白質アレルギーに感受性の個人のアレルギー性応答の緩和は、標準的臨床手順で測定した場合の、アレルギーに対する非応答性又は徴候の減少として規定することが出来る (Varney等, British Medical Journal 302:265-269 (1990) 参照)。

ここに説明する仕事の結果として、蛋白質アレルギー若しくは他の蛋白質抗原から導かれ、T細胞刺激活性を有し若しくは好ましくは少なくとも1つのT細胞エピトープをそれぞれ有する2つの領域を含むレコンビトープペプチドを生成した。T細胞エピトープは、それぞれアレルギー若しくは他の病気の臨床的徴候の原因となる蛋白質アレルギー若しくは他の蛋白質抗原に対する免疫応答の開始及び持続に関係すると考えられる。これらのT細胞エピトープは、抗原提示細胞の表面で適当なHLA分子に結合すること及び関連T細胞亜集団を刺激することによるTヘルパー細胞のレベルにおける初期事象の引き金を引くと考えられる。これらの事象は、T細胞の増

殖、リンホカインの分泌、局所的炎症反応、その部位への更なる免疫細胞の補充、及び抗体産生へ導くB細胞カスケードの活性化へ導く。これらの抗体の1つのイソタイプであるIgEは、基本的に、アレルギー症状の進展に重要であり、その生産は、Tヘルパー細胞のレベルにおいて、分泌されたリンホカインの性質によって、初期に事象のカスケードにおいて影響を受ける。T細胞エпитープは、T細胞レセプターによる認識の基本的要素若しくは最小単位であり、ここにエピトープは、レセプター認識に不可欠なアミノ酸を含み、蛋白質のアミノ酸配列において隣接し及び／又は隣接してなくてよい。T細胞エピトープは、ここで用いる場合、少なくとも2、0、一層好ましくは少なくとも2、5、更に好ましくは少なくとも3、5、最も好ましくは少なくとも5、0の刺激指標を有する。T細胞エピトープのアミノ酸配列に似せたアミノ酸配列、及び蛋白質アレルギーに対するアレルギー性応答を緩和するアミノ酸配列は、この発明の範囲内にある。

患者を蛋白質アレルギー若しくは他の蛋白質抗原に由来する本発明のレコンビトープペプチドにさらすと、適当なT細胞亜集団を寛容化若しくは無力化して、それらの蛋白質アレルギー若しくは他の抗原に対する感受性を低下させ、免疫応答を刺激することに関与しなくさせる。更に、蛋白質アレルギーから導いた本発明のレコンビトープペプチドの投与は、リンホカイン分泌プロフ

イルを、天然の蛋白質アレルギー若しくはその一部分にさらすことに匹敵する程に加減することが出来る（例えば、IL-4の減少及び／又はIL-2の増加を生じる）。更に、レコンビトープペプチドにさらすことは、通常アレルギーに対する応答に関係するT細胞亜集団に影響を与えて、それらのT細胞が普通アレルギーにさらされる部位（例えば、鼻粘膜、皮膚及び肺）から離れてレコンビトープペプチドを治療のために投与した部位に行くようにする。このT細胞亜集団の再分配は、個人の免疫系が、普通アレルギーにさらされる部位において通常の免疫応答を刺激する能力を改善若しくは減じて、アレルギー症状の減少を生じる。

この発明のレコンビトープペプチドは、好ましくは、少なくとも2つのT細胞エピトープを含む（例えば、レコンビトープペプチドは、少なくとも約8アミノ酸残基、好ましくは少なくとも15アミノ酸残基を含む）。この発明の他のレコンビトープペプチドは、同じ若しくは異なる蛋白質アレルギー又は他の蛋白質抗原に由来する少なくとも2つの領域を含み、該レコンビトープペプチドはT細胞刺激活性を有し、各領域は好ましくはヒトT細胞刺激活性を有し、従って、蛋白質アレルギー若しくは他の蛋白質抗原の少なくとも1つのT細胞エピトープを含む。一般に、かかるレコンビトープペプチドの領域の各々は、少なくとも1つの蛋白質アレルギーの少なくとも約7つのアミノ酸残基を含む。かかるレコンビ

トープペプチドの各領域は、好ましくは、少なくとも2つのT細胞エピトープを含む（例えば、レコンビトープペプチドは、少なくとも約8個のアミノ酸残基、好ましくは少なくとも15個のアミノ酸残基を含む）。この発明のレコンビトープペプチドは、所望するだけ多くのアミノ酸残基を含むことが出来、好ましくは、蛋白質アレルギー若しくは他の蛋白質抗原の少なくとも約7個、一層好ましくは少なくとも約15個、更に好ましくは少なくとも約30個、最も好ましくは少なくとも約40個のアミノ酸残基を含むことが出来る。レコンビトープペプチドの一領域は、好ましくは、45アミノ酸残基の長さまで、一層好ましくは40アミノ酸残基の長さまで、最も好ましくは30アミノ酸残基の長さまでを含み、レコンビトープペプチドの一領域の長さが増大するとペプチド合成が困難となり、その領域とそれが由来した蛋白質アレルギー若しくは他の蛋白質抗原との間のコンホメーションの類似性が維持されるために望ましくない特性が保持されるようになる（例えば、免疫グロブリン結合活性又は酵素活性）。所望であれば、これらの領域のアミノ酸配列を生成し、リンカーで結合して抗原提示細胞によるプロセッシングに対する感受性を増大することが出来る。かかるリンカーは、任意の非エピトープアミノ酸配列又は他の適当な架橋剤若しくは接合剤であってよい。

レコンビトープペプチドを蛋白質アレルギーから導いたときは、それらは、同じ属（*Dermatophagoides*属；

Felis 属； *Ambrosia* 属； *Lolium* 属； *Cryptosporia* 属； *Alternaria* 属； *Alder* 属； *Betula* 属； *Quercus* 属； *Olea* 属； *Artemisia* 属； *Plantago* 属； *Parietaria* 属； *Canina* 属； *Piptotella* 属、*Aply* 属； *Periplaneta* 属等）に由来する異なる蛋白質アレルギーから導かれた少なくとも2つの領域を含むことが出来る。更に、レコンビトープペプチドは、交差反応性の種に由来する少なくとも2つの領域を含むことが出来る（例えば、*Dermatophagoides pteronyssinus* に由来する領域と *Dermatophagoides farinosa* に由来する領域）。他の実施態様において、これらの領域は、同じ種から導くことが出来る（例えば、*Der p I* に由来する領域と *Der p II* に由来する領域； *Der f I* に由来する領域と *Der f II* に由来する領域； *Amb a I* に由来する領域と *Amb a II* に由来する領域； *Lol p I* に由来する領域と *Lol p IX* に由来する領域； *Cry j I* に由来する領域と *Cry j II* に由来する領域）。更に、レコンビトープペプチドは、同じ分類群に由来する異なる蛋白質アレルギーから導かれる少なくとも2つの領域を含むことが出来る（例えば、*Dermatophagoides pteronyssinus*（即ち、*Der p I*）の分類群I蛋白質アレルギーに由来する領域と *Dermatophagoides farinosa*（即ち、*Der f I*）の分類群I蛋白質アレルギーに由来する領域）。或は、これらの領域は、同じ科に由来する異なる蛋白質アレルギーから導くことが出来る（例えば、*Amb a I.1*、*Amb a I.2*、*Amb a I.3* 及び *Amb a*

I.4)。*Felis domesticus*に対する感受性を治療するために特に好適なレコンビトープペプチドは、*Felis* 属から導かれ、TRFPのペプチドX、Y、Z、A及びBから選択する領域(各ペプチドは配列番号7~11で表され、それらのアミノ酸配列を図4に示す)及びそれらの改変物例えばペプチドC(配列番号12)(ペプチドAへの1アミノ酸付加であり、図4に示す)を含む。好適レコンビトープペプチドは、ペプチドYZX及びペプチドAYZXBを含む。この出願においては、文字X、Y、Z、A、B及びCは、それぞれ、ペプチドX、ペプチドY、ペプチドZ、ペプチドA、ペプチドB及びペプチドCのことをいい、これらの文字を合わせて用いるとき(例えば、YZX)は、私たちは、ペプチドY、ペプチドZ及びペプチドXを逐次的順序で含むレコンビトープペプチドをいう(即ち、YZXとはペプチドYのアミノ酸配列の次に何らかの介在アミノ酸残基を有することなく直接ペプチドZのアミノ酸配列が続きその次に何らかの介在アミノ酸残基を有することなくペプチドXのアミノ酸配列が続くレコンビトープペプチドをいう)。この発明のレコンビトープペプチド例えばYZXは、レコンビトープペプチドのアミノ末端若しくはカルボキシ末端に更なるアミノ酸残基を含むことができる。

この発明のレコンビトープペプチドは、抗原特異的な免疫応答の増強又は低下が望まれる蛋白質抗原若しくは他の蛋白質アレルゲンから導くことができる。例えば、

たように、レコンビトープペプチドは、自己抗原から、どの領域がT細胞刺激活性を有するか若しくは正確なT細胞エピトープが何であるかを知ることなしに、構築することができる。これらのT細胞を刺激し且つ望ましくない自己抗原の特性を有しない(例えば、自己抗原に感受性の個人のかなりのパーセンテージにおいて自己抗体に結合しない)レコンビトープペプチドを、免疫療法剤又は診断用薬剤として利用するために選択する。治療用組成物の形態において、このレコンビトープペプチドを、生理的に許容し得るビヒクル中で、アジュバントなしで送達して、レコンビトープペプチドが自己抗原(それからレコンビトープが導かれる)に対する抗原特異的寛容を誘発し及び免疫応答に対する任意の潜在的障害を制御することを可能にする。レコンビトープペプチドの生成において有用な自己抗原には、糖尿病におけるインシュリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(64K)、PM-1及びカルボキシペプチダーゼ；多発性硬化症におけるミエリン塩基性蛋白質；胎児性赤芽球症におけるFh因子；重症筋無力症におけるアセチルコリンレセプター；グレーブズ病における甲状腺レセプター；グッドパスチャー症候群における基底膜蛋白質；及び甲状腺炎における甲状腺蛋白質がある。例えば、ヒトT細胞刺激活性を有するミエリン塩基性蛋白質(MBP)の領域(例えば、ヒトMBPのアミノ酸残基84~106、一層好ましくは84~102、更に好ましくは

自己免疫疾患の病因論に關係する公知の自己抗原のヒトT細胞刺激活性を有する領域又は公知の自己抗原のT細胞エピトープを同定し及びレコンビトープペプチドに合わせて自己抗原に対する抗体の応答を減じ、効力を妨げ及び/又は免疫複合体関連の副作用を減じることが出来る。自己抗原のT細胞反応性を保存するために、ヒトT細胞刺激活性を有する自己抗原の領域を種々T細胞生物学技術によって規定することが出来るであろうし、或は、所望であれば、正確なT細胞エピトープを、微細マッピング技術及び少なくとも2つの領域(各々はヒトT細胞刺激活性を有する)を含み、生成した少なくとも1つのT細胞エピトープを含むレコンビトープペプチドによって規定することが出来る。例えば、もしヒトT細胞刺激活性を有する3つの領域又は3つのT細胞エピトープが自己抗原中でアミノ末端からカルボキシ末端へ逐次的且つ隣接して1、2、3の順序で見出されたならば、各領域又は各T細胞エピトープを一度ずつ用いる6つの可能なレコンビトープペプチドを生成することが出来るであろう(3つの領域又はT細胞エピトープを種々の順序、例えば213、312、132、321、123、231で含む)。これらの6つのレコンビトープペプチドを、T細胞を刺激する能力について試験し及び自己抗原中に存在する望ましくない特性のないこと(例えばレコンビトープペプチドが自己抗体に結合することが出来ないこと)を試験することが出来る。或は、前に説明し

89~101の全部若しくは一部を含む領域及びヒトMBPのアミノ酸残基140~172、一層好ましくは143~168の全部若しくは一部を含む領域)は、多発性硬化症を治療するのに用いるためのこの発明のレコンビトープペプチドを構成し得る。

この発明の範囲内のレコンビトープペプチドを個人の蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原に対する感受性を治療し又は診断する方法において利用することが出来る。従って、この発明の1つの面は、レコンビトープペプチドと製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤とを含む治療用組成物を提供する。蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原に対する個人の感受性を低下させるための本発明の治療用組成物の投与は、公知の技術を用いて実施することが出来る。例えば、レコンビトープペプチドは、適当な希釈剤、キャリアー及び/又はアジュバント(適当であるならば)と組み合わせて投与することが出来る。製薬上許容し得る希釈剤は、塩溶液及び緩衝剤水溶液を含む。製薬上許容し得るキャリアーは、ポリエチレングリコール(We 等、*International Archives of Allergy and Applied Immunology* 84:84-99(1981))及びリボソーム(Strejan 等、*Journal of Neuroimmunology* 2:27(1984))を含む。製薬上許容し得るアジュバントはミョウバンを含む。かかる組成物は、一般に、注射(皮下注射、静脈注射等)、経口投与(例えば、カプセル形態)、吸入法、経皮投与又は直腸

投与によって投与することが出来る。この発明の治療用組成物を、レコンビトープペプチドが導かれるアレルゲン若しくは他の蛋白質抗原に感受性の個人に、そのアレルゲン若しくは他の抗原に対する個人の感受性を減じるのに有効な投与量及び期間で投与する。1種類以上の同じ若しくは異なる治療用組成物の治療上有効な量を、アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原に感受性の個人に同時に若しくは逐次的に投与することが出来る。これらの治療用組成物の有効量は、個人の感受性の程度、年齢、性別及び個人の体重、並びに個人におけるT細胞応答を刺激するペプチドの能力等の因子によって変化するであろう。本発明の更に他の面において、少なくとも2種のレコンビトープペプチドを含む組成物（例えば、少なくとも2種のレコンビトープの物理的混合物）を提供し、各々は、同じ若しくは異なる蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原から導かれる少なくとも2つのT細胞エпитープを含む。

えにより生成した蛋白質アレルゲン、又は蛋白質アレルゲンに由来するレコンビトープペプチドは、その蛋白質アレルゲンに特異的なIgEに結合せず、或はもしIgEの結合が起きたとしても、かかる結合は、そのアレルゲンに感受性の個人の集団のかなりのパーセンテージにおいてマスト細胞若しくは好塩基球からの媒介物質の放出を生じない。もし個人が、抗原、改変抗原若しくはそれらの一部に対する血液成分の結合を有すること及びレコンビトープペプチド、改変蛋白質抗原若しくはそれらの一部又は組換えにより生成した蛋白質抗原に応答するT細胞刺激が見出されたならば、その個人に、レコンビトープペプチド、組換えにより生成した蛋白質抗原又は蛋白質抗原若しくはその一部の改変型及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは増強剤を含む治療上有効な量の治療用組成物を投与してその個人の蛋白質抗原に対する感受性を低下させることが出来る。

本発明は又、個人における少なくとも1種の蛋白質アレルゲンに対する特定の遅延型過敏症を検出する方法をも提供する。この方法によって、遅延型過敏症試験（例えば、*Immunology* (1985) Rolitt, J.W., Brostoff, J., Male, D.K. (編集), C.V. Mosby Co., Gower Medical Publishing, London, NY, pp.19.2-19.18; pp22.1-22.10) を、改変型の蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原又はそれらの部分又は組換えにより生成した蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原、又は少なくとも1

本発明は又、蛋白質抗原に対する個人の感受性を検出する方法及び蛋白質抗原に特異的な免疫グロブリンの存在及びその抗原に反応する個人のT細胞の能力を測定する方法をも提供する。感受性を検出するために、個人から得た血液試料又はその試料の少なくとも一部を、蛋白質抗原、蛋白質抗原の改変型又は何れかの抗原の一部と合わせ、各々は、血液成分を抗原、改変抗原又はそれらの一部で結合するのに適した条件下でその抗原に特異的な免疫グロブリンに結合する。蛋白質抗原、改変抗原若しくはそれらの一部との血液成分の結合が見出された個人から得た第2の血液試料、又は蛋白質抗原、改変抗原若しくはそれらの一部との血液成分の結合が見出された個人からの第1の血液試料の第2の部分、T細胞刺激が起きるか否かを測定するために、蛋白質抗原から導いた少なくとも2つの領域を含むレコンビトープペプチド（該レコンビトープペプチドはT細胞刺激活性を有する）；又は蛋白質抗原から導いた少なくとも2つの領域を含むレコンビトープペプチド（各領域はヒトT細胞刺激活性を有する）；又は蛋白質抗原の改変型若しくはその一部；又は組換えにより生成した蛋白質抗原（各々は、蛋白質抗原に感受性の個人の集団のかなりのパーセンテージ（例えば、少なくとも約75%）において蛋白質抗原に特異的な免疫グロブリンに結合しない）と合わせる。もし蛋白質抗原が蛋白質アレルゲンであるならば、蛋白質アレルゲンの改変型若しくはその一部、組換

種の該蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原に由来するレコンビトープペプチド（各々は、ヒトT細胞刺激活性を有し及び、該蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原に感受性の個人のかなりのパーセンテージ（例えば、少なくとも約75%）において蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原に特異的な免疫グロブリンに結合しない）を用いて、個人に施す。二量体形態のTRFPの組換え鎖Iは顕著に減少したIgE結合を有するが、T細胞反応性を維持する（即ち、組換え二量体鎖IはペプチドX及びYを含み、これら両者は少なくとも1つのT細胞エпитープを含むことが知られている）こと及び弱アルカリ処理したTRFPは顕著に減じたIgE結合を有するが、T細胞反応性を維持していることが見出された。従って、二量体形態のTRFPの組換え鎖I又はアルカリ処理したTRFPを上記の遅延型過敏症試験又は他の診断用アッセイにおいて用いてTRFPのT細胞エпитープに対する個人の感受性を測定し及び/又はTRFPに対する個人の感受性を低下させるための治療用組成物において用いることが出来る。遅延型過敏症試験を施した後に、特定の遅延型過敏症がその個人において蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原に対して起きる程度（その個人における、その蛋白質アレルゲン若しくは他の蛋白質抗原のT細胞エпитープに特異的なT細胞の存在を示す）を測定する。

本発明は、更に、個人における少なくとも1種の蛋白質

質アレルギーに対する感受性を検出し治療する方法を提供する。少なくとも1種の蛋白質アレルギーに特異的なIgEの個人における存在及びそれらの個人のT細胞の蛋白質アレルギーのT細胞エピトープに反応する能力を、それらの個人に即時型過敏症試験及び遅延型過敏症試験を施すことによって測定することが出来る。これらの個人に即時型過敏症試験（例えば、Immunology (1985) Roitt, I.W., Brostoff, J., Male, D.K. (編集), C.V. Mosby Co., Gower Medical Publishing, London, NY, pp.19.2-19.18; pp.22.1-22.10を参照）を、蛋白質アレルギー若しくはその一部、又は蛋白質アレルギーの改変型若しくはその一部（各々は、アレルギーに特異的なIgEに結合する）を用いて施す。同じ個人に、即時型過敏症試験を施す前に、同時に、又は続いて遅延型過敏症試験を施す。勿論、もし即時型過敏症試験を遅延型過敏症試験の前に施すならば、遅延型過敏症試験は、特定の即時型過敏症反応を示した個人に対して行なわれる。遅延型過敏症試験は、改変型の蛋白質アレルギー若しくはその一部、組換えにより生成した蛋白質アレルギー又は蛋白質アレルギーから導いたレコンビトープペプチド（各々は、ヒトT細胞刺激性を有し且つ、そのアレルギーに感受性の個人の集団のかかなりのパーセンテージ（例えば、少なくとも約75%）のアレルギーに特異的なIgEに結合しない）を利用する。これらの特定の即時型過敏症反応及び特定の遅延型過敏症反応の両者を有するこ

とが見出された個人には、治療上有効な量の治療用組成物を投与する。この治療用組成物は、改変型の蛋白質若しくはその一部、組換えにより生成した蛋白質アレルギー、又はレコンビトープペプチド（各々、遅延型過敏症試験で使用）及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは増強剤を含む。

溶解度を増加させ、治療若しくは予防効果又は安定性（例えば、生体外での貯蔵寿命及び生体内での蛋白質加水分解による劣化に対する抵抗性）を増大する等の目的のためにレコンビトープペプチドの構造を改変することも又可能である。アミノ酸の置換、欠失又は追加等によりアミノ酸配列を変更して免疫原性を改変し及び／又はアレルギー誘発性を減じた、或は同じ目的のために成分を加えた改変したレコンビトープペプチドを生成することが出来る。例えば、T細胞エピトープ機能に不可欠なアミノ酸残基を、公知の技術（例えば、各残基の置換及びT細胞反応性の存否の測定）を用いて決定することが出来る。それらの不可欠に見える残基を改変することが出来る（例えば、その存在がT細胞反応性を増大させるように見える他のアミノ酸で置換する）、同様に、T細胞反応性に必要でない残基も改変することが出来る（例えば、その取り込みがT細胞反応性を増大させるが関連MHCへの結合を減じることのない他のアミノ酸で置換する）。レコンビトープペプチドの改変の他の例は、システイン残基の好ましくはアラニン又はグルタミン酸との

置換であり、或はセリン若しくはスレオニンと置換してジスルフィド架橋を介しての二量体形成を最小化することである。安定性及び／又は反応性を増大させるために、レコンビトープペプチドを改変して1つ以上の多形性（自然の対立遺伝子変化により生じる）を、蛋白質アレルギーのアミノ酸配列に取り込むことも又可能である。更に、D-アミノ酸、非天然アミノ酸又は非アミノ酸アナログでの置換又は付加により改変ペプチドを生成することがこの発明の範囲内で出来る。更に、レコンビトープペプチドを、A. Sehonと共同研究者（Wle 等、前掲書）のポリエチレングリコール（PEG）法を用いて改変してPEGと結合したペプチドを生成することが出来る。レコンビトープペプチドの改変は又、還元／アルキル化（Tarr: Methods of Protein Microcharacterization, J.E. Silver編 Humana Press, Clifton, NJ, pp.155-194 (1986)）；アシル化（Tarr: 前掲書）；エステル化（Tarr: 前掲書）；適当なキャリアーへの化学結合（Niselli 及び Shligi編 Selected Methods in Cellular Immunology, W H Freeman, San Francisco, CA (1980)；米国特許4,939,239号）；又は温和なホルマリン処理（Marsh International Archives of Allergy and Applied Immunology 41:199-215 (1971)）を含むことも出来る。

精製を容易にして、レコンビトープペプチドの溶解度を潜在的に増大するために、レポーター基をそのペプチ

ドの主鎖に付加することが出来る。例えば、ポリヒスチジンをレコンビトープペプチドに加えて、不動化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー上でレコンビトープペプチドを精製することが出来る（Hochuli, E. 等 Bio/Technology, 5:1321-1335 (1988)）。更に、所望であれば、特定のエンドプロテアーゼ開裂部位をレポーター基とレコンビトープペプチドのアミノ酸配列との間に導入して無関係の配列を含まないレコンビトープペプチドの単離を容易にすることが出来る。蛋白質抗原に対する個人の感受性をうまく低下させるためには、レコンビトープペプチドの溶解度を、官能基をそのペプチドに加えるか又は疎水性のT細胞エピトープ若しくは疎水性エピトープを含む領域をレコンビトープペプチド中に含まないことによって増大させることが必要であろう。

レコンビトープペプチド内のT細胞エピトープの適当な抗原プロセッシングを潜在的に助けるために、標準的なプロテアーゼ感受性部位を、組換えにより又は合成技術により、それぞれ少なくとも1つのT細胞エピトープを含む領域と領域の間に存在させることが出来る。例えば、帯電したアミノ酸対例えばKK又はRRを、レコンビトープペプチドの組換えによる構築の際に、レコンビトープペプチド内の領域間に導入することが出来る。その結果生成したレコンビトープペプチドは、カテプシン及び／又は他のトリプシン様酵素開裂に感受性となり、1つ以上のT細胞エピトープを含むレコンビトープペプ

チドの部分を生じることが出来る。更に、かかる帯電したアミノ酸残基は、レコンビトープペプチドの溶解度の増大を生じ得る。

レコンビトープペプチドをコードするDNAの部位特異的突然変異誘発を用いてレコンビトープペプチドの構造を改変することが出来る。かかる方法はPCR (Ho等, Gene 27:51-59(1989)) 又は突然変異遺伝子の全合成 (Kostowsky, 2等, Biochem. Biophys. Res. Comm. 151:1056-1063(1989)) を含んで良い。細菌での発現を増大させるために、前記の方法を他の手順と共に用いて、レコンビトープペプチドをコードするDNA構築物において真核生物コドンで大腸菌中で優先的に用いられるものに置き換えることが出来る。

本発明は又、この発明のレコンビトープペプチドをコードする核酸配列をも提供する。この発明の任意の実施態様において用いる核酸配列は、ここで説明するようなcDNAであってよく、或は、ここに表す配列の全部若しくは一部を有する任意のオリゴデオキシヌクレオチド配列又はそれらの機能の同等物であってよい。かかるオリゴヌクレオチド配列は、公知の技術を用いて、化学的に若しくは機械的に生成することが出来る。オリゴヌクレオチド配列の機能の同等物とは、1) オリゴヌクレオチド配列 (又は対応する配列部分) 若しくはその断片がハイブリダイズする相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることの出来る配列、又は2) オリゴヌクレ

オチド配列に相補的な配列 (又は対応する配列部分) 及び/又は3) オリゴヌクレオチド配列 (又は対応する配列部分) によりコードされる生成物と同じ機能の特性を有する生成物 (例えば、蛋白質、ポリペプチド又はペプチド) をコードする配列であるものである。機能の同等物が1つ以上の基準に適合しなければならないかどうかは、その利用によるであろう (例えば、もしそれが単にハイブリダイゼーションのプロブとして用いられるのであれば、第1若しくは第2の基準に適合すれば良く、それを本発明のペプチドを生成するために用いるならば、単に第3の基準に適合しさえすれば良い)。

後述の実施例において説明するように、ヒトT細胞反応性ネコ蛋白質 (TRFP) の鎖1 (配列番号1~4) 及び2 (配列番号5~6) を、組換えにより大腸菌内で発現させて精製した。TRFPアミノ酸配列から導いた重複するペプチド領域を用いるT細胞エпитーブの研究を用いてTRFPの各鎖中の複数のT細胞エпитーブを同定した。実施例2において詳細に説明するように、DNA構築物を組み立てたが、そこにおいて、それぞれTRFPの主要ヒトT細胞エпитーブを少なくとも1つ含む3つの領域 (ペプチドX、ペプチドY、ペプチドZと呼ぶ) を6通りの可能な組合せで結合して、6つの異なる構成の3つの領域を含むレコンビトープペプチドをコードする6つDNA構築物を生成した。ペプチドXが5アミノ酸をそのカルボキシ末端で、ペプチドYのアミノ

末端の5アミノ酸と共有しているもので、レコンビトープペプチドXYZ及びZXYは、該5アミノ酸の重複を有しても有さなくても構築することが出来る (ZXYが5アミノ酸の配列の重複を有せずに組み立てられている図11を参照されたい)。下記の実施例において、これらのレコンビトープペプチドを、5アミノ酸の重複なしで隣接して組み立てた。3領域X、Y及びZに加えて、それぞれ少なくとも1つのT細胞エпитーブを含む他の領域も又、これらのレコンビトープペプチド及び生成した4つ以上の領域 (N) 通りの構成、ここにN=領域の数) を有するDNA構築物に含まれ得る。或は、1つ以上の領域を、ペプチドX、ペプチドY又はペプチドZの替わりに、例えば図4に示すように、ペプチドA若しくはBを用いて、例えばレコンビトープペプチドAXYを生成することが出来る。

精製の助けとしてレコンビトープペプチドに付加した外来の配列の開裂及び除去のための詳細なプロトコルを説明する。精製したレコンビトープペプチドを、ヒトのネコアレルギー患者のIgEの結合についてウエスタンブロットにて試験し、TRFPの組換え鎖1及び2のIgE結合と比較した。ELISAを行なって、アレルギー性IgEのレコンビトープペプチドへの結合を天然のTRFP、組換え鎖1及び組換え鎖2と比較して試験した。ここに説明する仕事は、本発明のレコンビトープペプチドが、それらのエпитーブ構成が一般に天然の

TRFP蛋白質配列において見出されるものと異なってもT細胞刺激活性を有するというを示す。更に、レコンビトープペプチドの予防剤としての利用を、マウスを天然TRFP、TRFPの組換え鎖1若しくは鎖2又はレコンビトープペプチドを用いる抗原対抗にて低感受性にして示した。

この発明を下記の実施例により更に説明する。

実施例1 重複TRFPペプチドを用いるT細胞エпитーブ研究

末梢血液単核細胞 (PBMC) を、ネコアレルギーの臨床的徴候を示し、ネコ抽出物を用いた皮膚試験で陽性であったネコアレルギー患者からのヘパリンで凝血防止した血液60mlをFicoll-Hypaque遠心分離することにより精製した。個人の患者からの1000万個のPBMCを5%のブールしたヒトAB血清を含み且つグルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン及びHEPES緩衝液を補った10mlのRPMI 1640 (Gibco) (完全RPMI 1640) 中で、アフィニティー精製した天然TRFP 20 µg/mlを存在させて37℃で7日間培養した。次いで、生存力のある細胞をFicoll-Hypaque遠心分離によって精製し、更に2週間、5単位の組換えヒトIL-2/ml及び5単位の組換えヒトIL-4/mlを含む完全RPMI 1640中で培養し

た。次いで、この培養から生じた休止T細胞を、96ウェルマイクロ滴定プレートを用いる第2の増殖アッセイにおいて試験して、図3に示すように、種々のTRFPペプチド若しくは蛋白質（TRFP抗原）に対するT細胞応答を評価した。アッセイ用に、 2×10^4 の休止T細胞を完全RPMI 1640中で、 5×10^4 の自家PBMC（3500ラド）を抗原提示細胞として存在させて、各ウェル当たり200 μ lの量で種々の濃度のTRFP抗原の1つと共に3日間37℃で培養した。次いで、各ウェルに1 μ Ciのトリチウム化チミジンを用いて16時間与えた。取り込まれたカウントをガラス繊維フィルター上に集めて液体シンチレーション計数処理した。次いで、各ペプチドに対する応答の刺激指標を、培地のコントロールCPMで割った抗原に対する応答の最大CPMとして計算した。刺激指標2.5をT細胞応答陽性であるとみなした。（この出題で用いる場合、ヒトT細胞刺激活性を刺激指標少なくとも2.0と定義する。しかしながら、この発明のレコンビトープを生成するのに用いるべきT細胞エビトープ若しくは領域の刺激指標は、少なくとも2.0、好ましくは少なくとも2.5、一層好ましくは少なくとも3.5、最も好ましくは少なくとも5.0である。）34のかかる実験の結果の要約を図3に示す。トップ5ペプチドの、各患者由来のT細胞系統によるTRFPの領域1及び領域2をカバーするTRFPペプチドの重複した組に対する応答をランク付けして、最

高の陽性応答をa5、次に高い陽性をa4等とした。次いで、各ペプチドについて得られたランクの総計を計算したものを図3にヒストグラムで示す。この型の分析は、完全な蛋白質に対するT細胞応答におけるTRFP分子の異なる領域の相対的重要性を強調する。これらの結果は、この患者のパネルにおけるT細胞反応性の主要領域が、Fel-14.2（領域1、アミノ酸残基29～42）、Fel-3.1（領域1、アミノ酸残基18～32）、Fel-2（領域1、アミノ酸残基9～25）、Fel-21（領域1、アミノ酸残基56～70）、Fel-29（領域1、アミノ酸残基56～70）、Fel-1.2（領域1、アミノ酸残基1～17）、Fel-4（領域1、アミノ酸残基37～55）、Fel-18（領域2、アミノ酸残基23～48）、Fel-26（領域2、アミノ酸残基49～68）、Fel-16（領域2、アミノ酸残基1～22）、Fel-23（領域1、アミノ酸残基51～66）によって（重要性の順に）取り囲まれていることを示す。次いで、ペプチドの組を、これらの領域をカバーするようにデザインした。Fel-1.2、Fel-2、Fel-3.1及びFel-14.2の部分は、ペプチドX（領域1、アミノ酸残基7～33）を含む。Fel-3.1、Fel-14.2及びFel-4の部分は、ペプチドY（領域1、アミノ酸残基29～55）を含む。Fel-16、Fel-17及びFel-18の部分は、ペプチドZ（領域2、アミノ酸残基14～39）を含む。Fel-4、Fel-21及びFel-23の部分は、ペプチドAを含む。Fel-29の部分は、ペプチドBを含む。ペプチドX、Y、

Z、A及びBを図4に示す。

実施例2 レコンビトープペプチドの構築及び発現

合成オリゴヌクレオチドを用いるPCR法（ポリメラーゼ連鎖反応）を利用して、ペプチドX、Y及びZの配列をコードするDNAを構築した。大腸菌内での発現を増大させる目的で、オリゴヌクレオチド中のコドンで、高度に発現される大腸菌蛋白質において優勢なコドンの表から選択した。Sharp, P.M., 等, *Nucl. Acids Res.*, 15:8207(1988)。レコンビトープペプチドを構築するために用いたオリゴヌクレオチド及びPCR手順を以下に詳細に説明する。

オリゴヌクレオチドを、大腸菌好適コドンを用いて、図5及び6に表示するようにデザインした。これらのオリゴヌクレオチド（図7に示すC、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N及びO）（配列番号12～37）をPerkin Elmer/Cetus Gene Ampキットを用いて、2つの別々のPCR反応（PCR#1及びPCR#2、PCR#1はレコンビトープペプチドをコードするDNA分子の5'部分の合成を、PCR#2はレコンビトープペプチドをコードするDNA分子の3'部分の合成を生じた）。オリゴヌクレオチド（C～I）を用いて単一PCR反応を行なった場合にレコンビトープYZXの適当なPCR生成に干渉することが見出された配列（KALPV：（配列番号8のアミノ酸残基1～5））がペプチドX及びペプチドYの両方に存在するためにこの

アプローチを取った。レコンビトープペプチドAYZXの生成において、図6に示すように、PCR#1で用いたオリゴヌクレオチドは、N、J、K及びC～Iであり、PCR#2で用いたオリゴヌクレオチドは、C～I及びL、M、Oであった。レコンビトープペプチドYZXの生成において、図5に示すように、PCR#1で用いたオリゴヌクレオチドは、C、D、E及びFであり、他方、PCR#2で用いたオリゴヌクレオチドは、F、G、H及びIであった。各反応混合物（10mg）は、意図したYZX構造の5'側半分と3'側半分をそれぞれ生成した（図5）。これらのPCR混合物を、Taqポリメラーゼを加えた後に、下記の変性、アニーリング及び重合のサイクルを有するプログラムにかけた：

工程#	温度	時間
1	94℃	1分間
2	50℃	1.5分間
3	75℃	2分間
4	工程1～3を繰り返す（4回）	
5	94℃	1分間
6	50℃	1.5分間
7	75℃	2分間
8	工程5～7を繰り返す（20回）	
9	4℃に維持	

YZX構造の構築においてPCR#1及びPCR#2反応が完了した後、それぞれからのアリコート（10

μg の全反応混合物の100 pモル:1/100容積)を1組の5'及び3'プライマー(100 pモルのプライマーC及びI)を含む第3のPCR反応混合物に加えた。第3のPCR反応(PCR#3)を、この第3のPCR反応混合物を用いて、PCR#1及び#2について前述したようにして行なった(但し、工程6でのアニリング温度を65℃に高めた)。PCR#3の完了は、レコンビトープペプチドYZXをコードするDNAを生成した。PCR#3反応方法は、Horton, R.M.等 *Gene* 77:61(1988)に記載されたものと類似している。PCR#3で用いた全反応混合物を2%アガロースゲル上で分離し、ゲルスライスから適当なサイズのパンド(230 bp)を泳動溶出して沈殿させた。単離したレコンビトープペプチドYZXをコードするDNAを、過剰の5'及び3'増幅用プライマー(C及びI)を用いて別のPCR反応にかけた。この最終生成物を制限酵素BamHIで消化し、次いで、ベクターpET11dに入れて、ファージT7 gnl01a c0融合プロモーターの転写制御下でクローン化した。Studier, F.B.等, *Methods in Enzymol.* 185:60(1990)。

6つの連続的ヒスチジンをコードするポリリンカー、(CAC)₆、をフレームを合わせて、レコンビトープペプチドYZXをコードするDNAの5'末端にクローン化した。この6つのヒスチジン(H、若しくはHis6)リーダー配列は、CIAGEN NTA-アガロース(ドイツ

国、Dusseldorf在、Diagen社)、Ni⁺⁺キレート支持体を用いる発現したレコンビトープペプチドの精製を可能にした。Hochuli, E.等, *BioTechnology* 5:1321(1988)。部位特異的な酵素断片部位(例えば、トロンビン、因子X、等)をコードするDNAを、PCR法を用いて、ポリヒスチジンコード配列(H₆)とレコンビトープペプチド主鎖をコードするDNAとの間に挿入することが出来る。レコンビトープペプチドYZXの場合、トロンビン認識部位(LVPRGS)(配列番号72)を挿入した。Uhlen, M., Moks, T. *Methods in Enzymol.* 185:129(1990), Chang, J.-Y. *Eur. J. Biochem.* 151:217(1985)。

レコンビトープペプチドYZXをコードするDNAを構築するために上述したのと同じ手順を用いて、レコンビトープペプチドXYZ及びZYXをコードするDNAを構築した。更に、他のT細胞エピトープを含むペプチドを、存在するレコンビトープ主鎖構造例えばYZX(その生成は上述した)に追加することが出来、レコンビトープペプチドAYZXBの構築の場合等がそれである(図6及び7参照)。或は、T細胞エピトープを含むペプチドを、存在するレコンビトープ主鎖を利用せずにここに既述する方法を用いて生成することが出来る。レコンビトープペプチドAYZXBを生成するために、レコンビトープペプチドYZXの各末端に対する重複領域を有するオリゴヌクレオチドプライマー(J~M)及び

5'及び3'増幅用プライマー(N及びO)を生成した(図6に示すように、分子の薄黒くした部分が重複配列である)。PCR反応を上述のように行なった。その結果生成したAYZXB断片を単離してpET11dH₆THベクター中にサブクローン化した。

別の手順を用いて、レコンビトープペプチドXYZ、YXZ及びZYXをコードするDNAを構築した。レコンビトープペプチドXYZ、YXZ及びZYXをコードする各DNA構築物を、レコンビトープペプチドの最もN末端側のアミノ酸をコードするコドンにおいて、リーダー配列MGHHHHHHEF(配列番号73)(ここに、アミノ酸EFは、配列番号74で表されるEcoRI制限部位GAATTCによりコードされる)をコードするDNAと連結した。3つのレコンビトープペプチドをコードするDNAセグメントを、本質的にHorton等(1988) *Gene* 77:61-68により記載された連続的PCRによって組み立てた。ペプチドX、Y及びZ(図4に示す)をコードするDNAセグメントを、Kornegoren等(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:9690-9694に記載されたFei1d1cDNAから増幅した。特定の一例としてレコンビトープペプチドXYZコード配列の構築を示す図9に示すように、オリゴヌクレオチドプライマーをDNA配列を用いて合成したが、それは、単に特定のペプチドX、Y若しくはZをコードするDNAセグメントを増幅するだけでなく、隣接するペプチドX、Y若

しくはZをコードするDNAセグメントの小セグメント(9~18塩基対)を共有結合する。PCRを、Vent(商標)ポリメラーゼを用いて、New England Biolabの指示に従って、増幅プログラム30X[94℃ 1分/60℃ 1分30秒/72℃ 1分]を用いて行なった。PCR増幅に用いたプライマーを図10に示す。PCR増幅からの個々のレコンビトープペプチドをコードするDNA断片/リンカーDNA断片を3%(wt./vol.) NuSieve (FMC) アガロース中の調製用ゲル電気泳動により精製した。これらの個々のPCR断片を、次いで、第2のPCR反応において結合して、図9及び11に示すようなXYZをコードするDNA構築物を形成した。これらのPCR断片を結合させるために、初期PCR生成物を含む3% NuSieve ゲルスライスを70℃で溶融し、各1 μl を、5'RI(NH₂末端)及び3'Bam(COOH末端)プライマーを用いるVent(商標)PCRポリメラーゼ反応に加えた。

発現ベクターpET11d(Studier等, 1990)中に存在する制限部位の故に、すべての5'末端プライマーは、特定のレコンビトープのNH₂末端アミノ酸をコードするDNAとフレームを合わせて配列番号74で表されるEcoRIコード部位[GAATTC]を有し、他方、3'末端プライマーの末端は配列番号75で表されるBamHIコード部位[GGATCC]を有した。第2PCRから生成したレコンビトープペプチドXYZ

Y、YXZ及びZXZをコードするDNA構築物を、EcoRI/BamHI消化して、0.5 (wt./vol.) NuSieve (FMC) アガロースゲルを通して電気泳動した。DNA構築物を含むゲルスライスを70℃で溶融して、EcoRI/BamHI消化したBluescript KSプラスミッド(Stratagene)を用いる連結反応に加えた。この連結物をコンピタントXL-1 Blue バクテリア(Stratagene)中にトランスフォームし、挿入物を有する組換えプラスミッドを、Qiaprepキット(Diagen GmbH)を用いて単離した後に分析用制限消化によって同定した。挿入物の配列を、Sequenase IIキット(United States Biochemicals)を用いてジデオキシシチエンターミネーション配列分析によって確認した。

正しい複製配列を有するレコンビトープペプチドXYZ、YXZ及びZXZ挿入物をコードするDNA構築物を有するBluescript KSプラスミッドをEcoRI/BamHI消化し、それらのDNA構築物を、上述のように、発現ベクターpET11d中に、配列番号73で表されるNH₂末端リーダーMGHHHHHHEFをコードするDNAとフレームを合わせてサブクローン化するために0.6% SeaPlaque ゲルから単離した。これらの構築物をEcoRI/BamHI消化したpET11dHis、Amba1.1 HR中にサブクローン化した。この連結は、DNA構築物の挿入物(この場合、主要ブクサアレルゲンAmba1.1のcDNA)を交換

するの役に立った(Rafnar等(1991) J.Biol.Chem. 266:1229-1236)。pET11dHisAmba1.1ΔHRをpET11dから2工程で導いた。第1のpET11dをEcoRI/HindIII消化し、大腸菌DNAポリメラーゼのクレノー断片で平消化し及びそれを自身に連結してpET11dΔHR(HindIII及びEcoRI部位を欠くpET11dプラスミッド)を創った。次いで、pET11dHis、Amba1.1ΔHRを、HisAmba1.1カセットをNcoI/BamHI断片として発現ベクターpET11dHisAmba1.1から切除し、それをNcoI/BamHI消化したpET11dΔHR中に連結することにより形成した。組換えプラスミッドを、Qiaprepキットによる単離の後に分析用制限酵素消化により同定し、陽性のプラスミッドを発現用のコンピタントBL21[DE3]バクテリア中にトランスフォームした。BL21[DE3]は、lacUV5プロモーターの転写制御下のファージT7 RNAポリメラーゼ遺伝子を有する組換えファージ1海原DE3を含む。T7 RNAポリメラーゼ遺伝子発現は、IPTGの添加により誘発され、それは更にpETベクターT7gen101lacO融合プロモーターの3'側にサブクローン化した組換え遺伝子の高レベルの発現へと導く。

pSEM中にサブクローン化した、TRFP成熟鎖1及び2の(H₂)融合物をコードするPCRで誘導したDNA断片(1991年2月28日出願の米国特許出願

第662,276号)を切り出してpET11d中に連結した。これを、2つの鎖の3'末端のPstI部位にBclIリンカーを付け、それらの鎖の5'末端をNcoI消化し、及び5'NcoI/3'BclI断片を5'NcoI/3'BamHI消化したpET11d中に挿入することによって達成した。

TRFPの組換えペプチド鎖1及び2並びにレコンビトープペプチドXYZ、XZY、YZX、ZYX、ZXZ及びYXZを大腸菌内で発現して本質的に以下に概説するように複製した。pET11d発現DNA構築物を有するBL21DE3宿主細胞を、200µg/mlアンピシリンを調ったBHI寒天プレート(3.7%wt./vol. Difco Brain Heart Infusion; 1.5%wt./vol. Difco 寒天)上に線状接種して37℃で一晩インキュベートした。単一コロニーを2mlの200µg/mlアンピシリン/BHI培地(3.7%wt./vol. Difco Brain Heart Infusion)に接種し、300rpmにて37℃で濃濁する(但し、飽和には至らない)まで震盪した。次いで、2mlの培養物を100mlの200µg/mlアンピシリン/BHI培地に加え、300rpmで37℃にて濃濁する(但し、飽和に至らない)まで震盪し、その時点で培養物を、18×250ml(4.5リットル)の200µg/mlアンピシリン/BHI培地に分割して300rpmで37℃にて震盪した。培養のOD₆₀₀が1.0に達したとき、

(His)。融合ペプチドとしての組換えペプチドの発現を、IPTGを400µMに添加して2時間継続することにより誘発した。

細胞を10,000×g 15分の遠心分離によって集め、1/50倍容の6MグアニジンHCl、100mM 2-メルカプトエタノール、100mM NaPO₄、10mM トリス(pH8.0)に再懸濁した。組換え鎖1及び2並びにレコンビトープペプチド(組換えペプチド)を、再懸濁した細胞を1時間25℃で激しく攪拌することにより抽出した。この懸濁液を15,000×gの遠心分離にかけて、上清を取り出し、pHを10N NaOHで8.0に調節し、NTAアガロースカラム(6M グアニジンHCl、100mM NaPO₄、10mM トリス(pH8.0)で、溶出物のOD₂₈₀がバックグラウンドに達するまで平衡化しておく)に加えた。次いで、カラム緩衝液を、8M 尿素、100mM NaPO₄、10mM トリス(pH8.0)に交換した。平衡化の後、8M 尿素、100mM NaOAc、10mM トリス(pH6.3)中で、溶出物のOD₂₈₀がバックグラウンドに達するまで、更に厳重な洗浄を行なった。次いで、各組換えペプチドを(His₆融合物として)、8M 尿素、100mM NaOAc、10mM トリス(pH4.5)中で溶出し、アリコートを集めてそれらのOD₂₈₀プロフィールをモニターした。そのペプチドピークを、分析用に、50

0 容の P B S (リン酸緩衝塩溶液) 中に 3 回透析した。収量は、一般に 90% を超える純度 (SDS ポリアクリルアミドゲルの濃度走査により測定) で、組換えペプチド (H i s.) 融合物 2 ~ 25 m g / l であった。

上述の組換えペプチド (T R F P 鎖 1, T R F P 鎖 2, X Y Z, Y Z X 及び Z Y X) は、すべて、精製及び発現を助けるために加えられた配列番号 76 で表される N 末端配列 (例えば、M G H H H H H L V P R G S -) を有する。この無関係の N 末端配列は、配列が、ポリヒスチジン配列とレコンビトープ配列との間に挿入された配列番号 72 で表されるトロニン部位 (L V P R G S) を含むので、蛋白質加水分解消化によって除去することが出来る (図 8 参照。矢印はトロニン開裂部位を示す)。トロニンをを用いて 2 つの余分なアミノ酸残基のみの残留無関係配列、即ち、T R F P 鎖 1 及び 2 並びにレコンビトープペプチド X Y Z, Y Z X 及び Z Y X の N 末端の G S を開裂させた (Chang, J.-Y., Eur. Biochem. 151:217-224 (1985))。融合蛋白質の効率的開裂は、蛋白質対トロニンの比 1000 対 1 を 25℃ で 2 時間用いることにより達成することが出来る。レコンビトープペプチド Y Z X を精製するために用いた開裂及び精製の計画を以下に概説する:

- 1) レコンビトープペプチド M G H H H H H L V P R G S - Y Z X
- 2) P B S (p H 8.0) 中に透析する
- 3) トロニン開裂

タンイムノブロット分析を行なった。すべての蛋白質試料 (例えば、T R F P, T R F P の組換え鎖 1, T R F P の組換え鎖 2, レコンビトープペプチド X Y Z, レコンビトープペプチド X Z Y, レコンビトープペプチド Y X Z, レコンビトープペプチド Y Z X, レコンビトープペプチド Z X Y 及びレコンビトープペプチド Z Y X) のゲル電気泳動用濃度を B C A 法 (Pierce Co.) により測定した。すべての蛋白質試料を 5 μ g / レーンでゲルに載せた (但し、T R F P は 10 μ g / レーン)。蛋白質分離を、15% アクリルアミドゲル上で行ない、ニトロセルロース紙 (Schleicher and Schuell, 0.1 ミクロン) 上へのトランスファーを、Hoeffer 装置中で、Towbin, H., T. Staehlin 及び J. Gordon, PNAS 76:4350 (1979) のプロトコールに従って、1.5 アンペア 1.5 時間のエレクトロブロッティングにより行なった。蛋白質をブロット溶液 (25 mM トリス-HCl 7.5, 0.171 M N a C l 及び 0.5 m l / リットル Tween 20) 中ですすいだ。次いで、そのブロットをブロック溶液 (ブロット溶液中の 1% ミルク) 中で 1 時間ブロックした。第 1 の抗体源として用いた患者 # 417 からの血漿をブロック用溶液で 10% に希釈して、使用液ニトロセルロース (2 cm x 15 cm) で 1.5 時間にわたって予備吸収した。調製したヒト血漿を、次いで、一晚、開心ある蛋白質ブロットセクションと共にオービクル震盪機上でインキュベートした。第 1 の抗体インキ

ペプチド: トロニン = 1000 : 1

25℃, 2 時間

4) 5 M グアニジン H C L 中の 100 mM ジチオスレイトールで還元

37℃, 30 分

5) C. 逆相 H P L C, p H 2.0

6) 凍結乾燥

分析用逆相 H P L C を V Y D A C 214 T P 54 カラム上で 42 m l 床容積にて行なった。そのカラムに 340 μ g のレコンビトープペプチド Y Z X を載せた。半調製用 H P L C を、V Y D A C 214 T P 1022 カラムを用いて 95 m l 床容積にて 90 m g の蛋白質を載せて行なった。0% から開始して 30% に至る 0.1% トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル勾配を最初の 10 分間続け、その後 30 ~ 43% アセトニトリル勾配を 15 分間続けた。次いで、移動相を 43% アセトニトリルにて 10 分間保持した。精製されたレコンビトープペプチド Y Z X が 43% アセトニトリルにて溶出した。開裂及び精製を S D S - P A G E によってモニターした。レコンビトープペプチド Y Z X の同定及び純度を、Applied Biosystems 社、Protein Sequencer Model 477A を用いる配列分析により決定した。

実施例 3 I g E の T R F P 蛋白質及びレコンビトープに対する直接結合アッセイ

実施例 2 で生成したレコンビトープペプチドのウエス

ユベーションの後、ブロットセクションを、3 回洗った (各洗浄は、ブロット溶液中での 15 分間のインキュベーションを含む)。ヒト I g E に特異的な第 2 の抗体 (ビオチン化ヤギ抗ヒト I g E, KPL Inc.) を、ブロット溶液中で 1 : 2500 に希釈し、インキュベーションを 2 時間続けた。続いて、過剰の第 2 抗体を、ブロット溶液中で 15 分ずつ 3 回インキュベートすることにより除去した。***I でヨウ素化したストレプトアビジン (Amersham) をブロット溶液中で 1 : 2500 に希釈して、ブロットと共に 50 m l のインキュベーション容積中の 2 μ C i にて 1 時間インキュベートした。次いで、ブロットセクションを、廃棄溶液中の検出可能な放射能がバックグラウンドレベルにまで減少するまでブロット溶液で洗浄した。次いで、ブロットセクションをサラップで包み、クロマト増強スクリーンを用いて一晚 ~ 80℃ でフィルムに露出した。図 13 に示した I g E 結合パターンは、アフィニティー精製した T R F P (レーン 1)、鎖 1 (分子量 6 K D) 及び鎖 2 (分子量 16 K D 以上) に対する反応性を示した。組換え鎖 1 は、強い I g E 結合 (レーン 2) を示すが、他方、組換え鎖 2 の反応性は、鎖 1 に比べて低い (レーン 3)。これらの I g E 結合を示すレコンビトープペプチドは、ペプチド X Y Z 及び Z X Y である (それぞれ、レーン 4 及び 8)。すべての他のレコンビトープペプチドは、この分析方法によって、I g E 結合について陰性である。

I g E のレコンビトープペプチドへの特異的な結合は、又、E L I S A アッセイにおいても示された。被覆アッセイプレート (#25882-96) を、 $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ の図 14 に列挙した各被覆抗体 (即ち、T R F P、鎖 1 (T R F P の組換え鎖 1)、鎖 2 (T R F P の組換え鎖 2)、レコンビトープペプチド X Y Z、レコンビトープペプチド X Z Y、レコンビトープペプチド Y X Z、レコンビトープペプチド Y Z X、レコンビトープペプチド Z X Y 及びレコンビトープペプチド Z Y X) で、 $50 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ で覆って一晩 4℃ でインキュベートした。被覆抗原を除去してウェルをウェル当り $200 \mu\text{l}$ の P B S 中の 0.5%ゼラチンで 2 時間室温でブロックした。患者 #669 からの血漿を P B S-Tween 20 (0.05% 非イオン性洗剤 Tween20 (ミズーリ州、St. Louis 在、Sigma 社) を含む P B S) で連続希釈し、ウェル当り $100 \mu\text{l}$ を加えて一晩 4℃ でインキュベートした (血漿希釈を二重に試験した)。第 2 抗体 (ビオチン化ヤギ抗ヒト I g E、1:1000、メリーランド州、Gaithersburg 在、Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.) を $100 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ で、室温で 1 時間加えた。この溶液を取り出し、次いで、ストレプトアビジン-H R P O、1:10,000 (アラバマ州、Birmingham 在、Southern Biotechnology Associates, Inc.) を $100 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ で 1 時間室温で加えた (すべてのウェルを、各インキュベーション工程の間に、P B S-

Tween で 3 回洗った)。TMB Membrane Peroxidase Substrate システム (Kirkegaard & Perry Laboratories) を新たに混合してウェル当り $100 \mu\text{l}$ ずつ加えた。色を 2~5 分間展開させた。反応を、ウェル当り $100 \mu\text{l}$ の 1 M リン酸の添加により停止させた。プレートを、 450nm フィルターを付けた Microplate EL 310 Autoreader (バーモント州、Winoski 在、Biotek Instruments) 上で読んだ。二重のウェルの吸光度レベルを平均した。E L I S A アッセイのグラフ化した結果 (希釈の対数対吸光度) を図 14 に示す。

この図 14 に示す E L I S A の結果は、T R F P に対する I g E の高レベルの結合並びに T R F P 鎖 1 (鎖 1) 及び鎖 2 (鎖 2) に対する幾分か低い結合を示す。これらの 2 つの組換え鎖は、この特定の患者の I g E に同等の結合を示している。レコンビトープ Z X Y のみが I g E との明確な反応性を示しただけである。他のレコンビトープペプチドの結合は、レコンビトープペプチド X Y Z から僅かにシグナルがあるが、殆どバックグラウンドレベルである。レコンビトープペプチドが E L I S A とウエスタンアッセイの両者において等量存在することを示すために、抗ペプチド抗血清を陽性コントロールとして用いたが、それは、すべてのレコンビトープペプチドを有するレーン及びウェルに対して公平に同等のシグナルを与えた。

実施例 4 レコンビトープペプチドに対するヒト T 細胞エпитオプの応答

ヒトのネコアレルギー性 T 細胞のレコンビトープペプチドに対する応答を試験した。末梢血液単核細胞 (P B M C) を、ネコアレルギーの臨床的徴候を示し且つネコ抽出物を用いた皮膚試験陽性のネコアレルギー患者からのヘパリンで凝血防止した末梢血液 60ml を Ficoll-Hypaque 遠心分離することにより精製した。個々の患者からの 1000 万個の P B M C を、5% のブールしたヒト A B 血清を含み且つグルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン及び H E P E S 緩衝液を補った 10ml の R P M I 1640 中で、アフィニティー精製した天然 T R F P を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で存在させて或は $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した未開裂レコンビトープペプチド Y X Z 又は $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した開裂レコンビトープペプチド Y Z X と共に 37°C で 7 日間培養した。レコンビトープペプチド Y Z X を実施例 2 に説明したようにトロンピンで開裂させた。次いで、生存力のある細胞を Ficoll-Hypaque 遠心分離により精製し、更に 2 週間、5 単位の組換えヒト I L - 2/ ml 及び 5 単位の組換えヒト I L - 4/ ml を含む R P M I 1640/5% A B 血清中で培養した。次いで、休止 T 細胞を 96 ウェルマイクロ滴定プレートを用いる第 2 の増殖アッセイにおいて試験して種々の T R F P 蛋白質若しくはペプチド (T R F P 抗原) に対する T 細胞応答を評価した。アッセイに、2

$\times 10^4$ の休止 T 細胞を、 2×10^4 の自家エプスタイン-バールウイルスでトランスホームした B 細胞 ($25,000$ ラド) を抗原提示細胞として存在させて、各ウェル当り $200 \mu\text{l}$ の量で種々の濃度の抗原と共に 3 日間 37°C で培養した。次いで、各ウェルに $1 \mu\text{Ci}$ のトリチウム化チミジン 16 時間与えた。取り込まれたカウントをガラス繊維フィルター上に集めて液体シンチレーション計数処理にかけた。次いで、各抗原に対する応答の刺激指標を、増殖コントロール C P M で割った抗原に対する応答の最大 C P M として計算した。刺激指標 2.5 を陽性 T 細胞応答とみなした。3 つのかかる実験 (患者 522、519 及び 386) の結果の要約を図 15a、15b 及び 15c に示す。図 15a 及び 15b に示した実験と比較して、図 15c に示した実験において、ペプチド X 及び Z の構成アミノ酸を一層似させるために、Fel-1.4 (鎖 1、アミノ酸残基 6~17) を Fel-1.2 (鎖 1、アミノ酸残基 1~17) の代りに用い及び Fel-33.3 (鎖 2、アミノ酸残基 26~40) を Fel-18 (鎖 2、アミノ酸残基 23~48) の代りに用いた。更に、この実験において、レコンビトープペプチド Y Z X の Y-Z 接合物 (T R F P の鎖 1 からのアミノ酸残基 50~55 及び T R F P の鎖 2 からのアミノ酸残基 14~19) から誘導した 1 つのペプチドとレコンビトープペプチド Y Z X の Z-X 接合物 (T R F P の鎖 2 からのアミノ酸残基 34~39 及び T R F P の鎖 1 からのアミ

ノ酸残基7~12)から誘導される1つのペプチドとを合成し及び試験した。これらの接合ペプチドを、レコンビトープペプチドYZXのこれらの領域がレコンビトープペプチド内に形成されたときに非天然エпитープを生成するか否かを測定するために製造した。

これらの結果は、天然TRFPで活性化された患者522からのT細胞が、天然TRFP、レコンビトープペプチドYZX、ペプチドY、Fel-14.2及びFel-17に対して陽性に応答することを示している。対照的に、レコンビトープYZXで活性化されたT細胞は、天然TRFPに対してはそれ程よく応答しないが、TRFP分子の、ペプチドX、ペプチドY、ペプチドZ、Fel-4、Fel-3.1、Fel-2、Fel-14.2、Fel-17及びFel-18を含む部分に対応する幾つかの合成ペプチドに対しては同程度若しくはより一層よく応答する。患者519からのT細胞を用いた実験の同様の結果を図15bに示す。この患者からの天然TRFPで活性化したT細胞は、天然の精製TRFP、レコンビトープペプチドYZX及びペプチドYに対して応答する。同じ患者の細胞をレコンビトープペプチドYZXで活性化した場合、陽性応答は、天然TRFP、レコンビトープペプチドYZX、ペプチドX、ペプチドY、ペプチドZ、Fel-3.1、Fel-4及びFel-17に対して見られた。図15cは、活性化剤として生成した開裂済レコンビトープYZXを含む同様の実験を示す。これらの結果は、天然TRFPで活性化された患者

386からのT細胞は、天然TRFP、レコンビトープペプチドYZX、ペプチドX、ペプチドY、Fel-3.1及びFel-14.2に対して陽性に応答することを示している。対照的に、レコンビトープペプチドYZXで活性化されたT細胞は、天然TRFP、レコンビトープペプチドYZX、ペプチドX、ペプチドY、ペプチドZ、Fel-2、Fel-3.1、Fel-14.2及びFel-17に対して同レベル若しくはそれ以上によく応答する。これらのデータは、少なくともこれらの3人の患者においては、T細胞が、レコンビトープペプチドとして存在するTRFP T細胞エпитープを効率的に認識することを示している。これらの実験で試験した天然TRFP分子中に存在するエпитープは、何れもYZXレコンビトープペプチドとの関連において破壊されていない。これらの実験におけるレコンビトープペプチドYZX若しくはYZXのTRFPエпитープを提供する能力は、天然分子に比べて一層大きい。患者386からの結果は、レコンビトープYZXの接合領域(YZ接合ペプチド及びZX接合ペプチド)から導いたペプチドが、レコンビトープペプチド中に存在するときに、T細胞により認識され、従って、非天然エпитープがこの接合領域に創られたことを示している。

実施例5 マウスT細胞のレコンビトープペプチドに対する応答

マウスをレコンビトープYZXで免疫して、TRFP

由来のレコンビトープペプチド中に含まれるT細胞エпитープがT細胞応答を刺激することが出来るかどうかを測定した。このアッセイで、リンパ節細胞の個々のレコンビトープペプチド並びに免疫化抗原に対して応答する能力を測定した。

10B6CBFAF1マウスを、尾の基部及び腿領域に完全フロイントアジュバント中の100 μ gのレコンビトープペプチドYZXを皮下注射して免疫した。10日後、免疫したマウスの鼠径節、傍大動脈節及び膝窩節を取り出してプールした。これらのリンパ節を、ステンレス網メッシュを通すことにより、1%ウシ胎児血清(FBS)を含む冷RPMI 1640に懸濁した。これらの細胞を、1%FBSを含む冷RPMI 1640で2回洗って4 $^{\circ}$ Cに維持した。

これらのリンパ節細胞を、10%FBS、250 μ g/mlペニシリンG、100 μ g/mlストレプトマイシン及び 5×10^{-4} M 2-メルカプトエタノールを含むRPMI 1640中に 4×10^5 細胞/mlでプレートした。これらの細胞を、示したように抗原(即ち、レコンビトープペプチドYZX、レコンビトープペプチドZYX、レコンビトープペプチドYZ、レコンビトープペプチドXZY、ペプチドX、ペプチドY、ペプチドZ、ペプチドX、Y及びZ並びにAb.a I)と共に培養した(図16)。24時間後、50 μ lの上清を各培養から取り出し、一晚凍結して生細胞の増殖を排除した。この上清を37 $^{\circ}$ Cに加熱して洗

淨した。CTL-2指示細胞(ATCC#TIB214)を加えた(5×10^4 細胞/ウェル)。この指示細胞系統は、連続成長のためにIL-2を必要とする。24時間後、H⁺-チミジン(1 μ Ci/ウェル)を加えて更に細胞を4時間インキュベートした。これらのプレートを凍結して解凍し、Toitec 96ウェル採取機(コネチカット州、Orange在、Toitec)で採取して、Betaplate ベータカウンター(メリーランド州、Gaithersburg在、Pharacia)にて計数した。

プールしたリンパ節細胞は、IL-2産生により測定するとき、イン・ビトロで、レコンビトープペプチドYZXとの培養に対してよく応答する(図16)。培地のバックグラウンドは、平均1500cpmだけであった。レコンビトープペプチドYZXに対するT細胞の応答は、レコンビトープペプチドを構成するために用いたエпитープを含む個々のペプチド(即ち、ペプチドX、Y及びZ)に対する応答の一つ若しくは組合せから生じ得る。他のレコンビトープペプチド並びに個々のペプチドX、Y及びZをリンパ節細胞と共に培養してT細胞の応答を測定した。ペプチドX、Y及びZの各々(成分ペプチド)に対する有意の応答があった。幾つかの他のレコンビトープペプチドZYX及びXZYに対する強いT細胞応答があった。これらのレコンビトープペプチドと同じアミノ末端リーダー配列を有する組換えAb.a I 調製物に対する弱い有意のT細胞応答があった。

実施例6 アレルギー疾患の診断へのレコンビトープペプチドの応用

レコンビトープペプチドは、新しい形態の蛋白質アレルゲン若しくは蛋白質抗原に対する感受性の診断として有用であり得る。例えば、この発明の好適レコンビトープペプチドはIgEに結合しないが、蛋白質アレルゲンから導かれるある種のレコンビトープペプチドは、アレルギー患者のIgEに結合することが出来る。これらのレコンビトープペプチドを、皮膚試験においてそのレコンビトープペプチドが導かれる蛋白質アレルゲンに対する個人における特異的な即時型過敏症(ITH)の正確なアッセイとして用いることが出来る。ITH応答を誘出するアレルゲンは又、レコンビトープペプチドに加えて、組換えで生成したアレルゲン、天然の源から生化学的に精製したアレルゲンであってもよく、必要なことは特異的IgE反応性が高いことだけである。ヒトIgEとの反応性を全く又は非常に僅かしか示さないが蛋白質アレルゲンと反応性のT細胞エпитープを含むレコンビトープペプチドを用いて、それらのエピトープが導かれるアレルゲンに感受性の個人における遅延型過敏症(DTH)反応を誘出することが出来る。DTH応答を生じるためのアレルゲン形態は、単離されたレコンビトープペプチド、組換えアレルゲン又は化学的改変した天然若しくは組換えアレルゲンであってもよい(例えば、KOH処理したTRFP)。再び、アレルゲン/抗原を刺激す

るDTHの主な要求は、IgE結合反応性のないこと、或は、もしかかる結合が起きたとしてもマスト細胞若しくは好塩基球から媒介物質が放出されないことであり及び投与した際に個人においてT細胞を刺激する能力である。陽性DTHは、レコンビトープペプチド内のエピトープに特異的な個人のT細胞を指示する。一般に、レコンビトープペプチドは、個々のT細胞エピトープを含むペプチドより大きい分子であり、従って、DTH試験に有利である。これらのレコンビトープペプチドは大きい分子であるので、それらは、DTH皮膚応答に寄与するTリンパ球及び他の細胞を流入させる皮膚(注射部位)に存在すると考えられる。

皮膚試験の15〜30分以内に起きるITH反応を、DTH反応と組合せて利用することが出来る(DTH反応は、48〜72時間後に現れる)。それは、これらの2つの異なる型のアレルギー疾患関連反応性についてのアッセイの組合せであり、新規な診断用組成物を表す。レコンビトープペプチドを用いる皮膚試験における皮膚への適用は、1つの応答を他のものに対して誘出する(ITH対DTH)のために異なる様式を要求することが出来る。例えば、ITH反応を個人において、レコンビトープペプチド(この場合においては、IgE反応性レコンビトープペプチド)及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む非常に少量の治療用組成物を用いるブリック試験によって誘出することが出来る。DTH

H反応を誘出するために、多量のレコンビトープペプチド(この場合は、非IgE反応性レコンビトープペプチド)及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む治療用組成物は、皮内注射又は尖叉試験形式によって適用する(両者は、DTHによるTB試験に用いられている)。Immunology(1985) Roitt, J. M., Brostoff, J., Hale, D. K. (編集), C. V. Mosby Co., Gower Medical Publishing, London, NY, pp. 19.2-19.18; pp. 22.1-22.10.を参照されたい。この発明のレコンビトープペプチドを用いる診断の後に、特定の感受性低下治療に対する個人を、1組の試験においてIgE反応性及びTエピトープ反応性を限定することによって選択することが出来る。

配列表

(i) 一般的情報:

(i) 出願人: イノバク ファーマセウティカルズ・インコーポレイテッド

(ii) 発明の名称: レコンビトープペプチド

(iii) 配列数: 77

(iv) 通信用住所:

(A) 宛名人: 517 777 コッツウィー・ストリート

(B) 通り: ストート・ストリート 60, スイート 510

(C) 都市: ボストン

(D) 州: マサチューセッツ

(E) 国: 米国

(F) 郵便番号: 02109

(v) コンピューター読み取り可能形式:

(A) 媒体型: フロッピーディスク

(B) ソフトウェア: IBM PC 互換機

(C) オペレーティングシステム: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア: ASCIIテキスト

(vi) 現出願のデータ:

(A) 出願番号: PCT/US92/08694

(B) 出願日: 1992年10月16日

(C) 分類:

(vii) 先願のデータ :

- (A) 出願番号 : U S 7 7 7 , 8 5 9
 (B) 出願日 : 1 9 9 1 年 1 0 月 1 6 日
 (C) 分類 :

(viii) 先願のデータ :

- (A) 出願番号 : U S 8 0 7 , 5 2 9
 (B) 出願日 : 1 9 9 1 年 1 2 月 1 3 日
 (C) 分類 :

(viii) 代理人 / 代理業者の情報 :

- (A) 名称 : アミ E. マンドラゴラス
 (B) 登録番号 : 3 6 , 2 0 7
 (C) 参照 / 登録簿番号 : 027.0 PCT (IMI-D15PC)

(ix) 電信用情報 :

- (A) 電話 : (6 1 7) 2 2 7 - 7 4 0 0
 (B) ファックス : (6 1 7) 2 2 7 - 5 9 4 1

(2) 配列番号 1 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ : 4 1 8 塩基対
 (B) 型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 一本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : c D N A

(ix) 配列の特徴 :

- (A) 特徴を表す記号 : C D S
 (B) 存在位置 : 8 . . 2 8 3

(xi) 配列 (配列番号 1) :

```

CTGCATC ATG AAG GGG GCT GGT GTT CTC CTC CTT CTC TGG GCT GGC      46
Met Lys Gly Ala Arg Val Leu Val Leu Leu Trp Ala Ala
-20 -15 -10
TTG CTC TTT ATC TGG GGT GGA AAT TGT GAA ATT TGC CCA GCC GTG AAG      94
Leu Leu Leu Ile Trp Gly Gly Asn Cys Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys
-5 1 5
AAG GAT GTT GAC CTA TTC CTG ACC GGA ACC CCC GAC GAA TAT GTT GAG      142
Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu
10 15 20
CAA CTG CCA CAA TAC AAA GCA CTA CCT GTA GTA TTG GAA AAT GCC AGA      190
Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg
25 30 35
ATA CTG AAG AAC TGC GTT GAT GCA AAA ATG ACA GAA GAG GAT AAG GAG      238
Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu
40 45 50
AAT GCT CTC AGC TTG CTG GAC AAA ATA TAC ACA AGT CCT CTG TGT      286
Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Cys
60 65 70
TAAAGGAGCC ATCACTGCCA GGAGCCCTAA GGAAGCCACT GAAGTATCA CTAACTAGTC      343
TCAGCAGCCT GCCATGCCA GGTGTCTTAC TAGAGGATTC CAGCAATAAA AGCCTGCCAA      403
TTCAAAACAA AAAAAA
418

```

(2) 配列番号 2 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ : 9 2 アミノ酸
 (B) 型 : アミノ酸
 (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : 蛋白質

(xi) 配列 (配列番号 2) :

```

Met Lys Gly Ala Arg Val Leu Val Leu Leu Trp Ala Ala Leu
-20 -15 -10
Leu Leu Ile Trp Gly Gly Asn Cys Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg
-5 1 5
Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln
10 15 20
Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile
25 30 35
Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn
40 45 50
Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Cys
60 65 70

```

(2) 配列番号 3 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ : 4 2 0 塩基対
 (B) 型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 一本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : c D N A

(ix) 配列の特徴 :

- (A) 特徴を表す記号 : C D S

(B) 存在位置 : 2 6 . . 2 8 9

(xi) 配列 (配列番号 3) :

```

GGCCTGGCGG TGCTCTCGGA AAGGG ATG TTA GAC GCA GCC CTC CCA      46
Met Leu Asp Ala Ala Leu Pro
-15
CCC TGC GCT ACT GTT GCG GCC ACA GCA GAT TGT GAA ATT TGC CCA GCC      94
Pro Cys Pro Thr Val Ala Ala Thr Ala Asp Cys Glu Ile Cys Pro Ala
-10 -5 1 5
GTG AAG AGG GAT GTT GAC CTA TTC CTG ACC GGA ACC CCC GAC GAA TAT      142
Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu Tyr
10 15 20
GTT GAG CAA GTG GCA CAA TAC AAA GCA CTA CCT GTA GTA TTG GAA AAT      190
Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu Asn
25 30 35
CCC ACA ATA CTG AAG AAC TGC GTT CAT GCA AAA ATG ACA GAA GAG GAT      238
Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu Asp
40 45 50
AAG GAG AAT GCT CTC AGC TTG CTG GAC AAA ATA TAC ACA AGT CCT CTG      286
Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser Pro Leu
55 60 65
TGT TAAAGGAGCC ATCACTGCCA GGAGCCCTAA GGAAGCCACT GAAGTATCA      343
Cys
CTAAGTAGTC TCAGCAGCCT GCCATGCCA GGTGTCTTAC TAGAGGATTC CAGCAATAAA      399
AGCCTGCCAA TTCAAAACAA A
420

```

(2) 配列番号 4 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ : 8 8 アミノ酸
 (B) 型 : アミノ酸
 (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : 蛋白質

(xi) 配列 (配列番号 4) :

Met Leu Asp Ala Ala Leu Pro Pro
-15
Cys Pro Thr Val Ala Ala Thr Ala Asp Cys Glu Ile Cys Pro Ala Val
-10 -5 1 5
Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val
10 15 20
Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu Asn Ala
25 30 35
Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys
40 45 50
Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Cys
55 60 65 70

(2) 配列番号 5 の情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 476塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : cDNA

(ix) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : C D S

(B) 存在位置 : 8...334

(xi) 配列 (配列番号 5) :

Met Arg Gly Ala Leu Leu Val Leu Ala Leu Leu Val Thr Gln
-15 -10 -5
Ala Leu Gly Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val
1 5 10
Phe Phe Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Asp Leu Ser Leu
15 20 25
Thr Lys Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile
30 35 40 45
Gln Asp Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly
50 55 60
Leu Val Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala
65 70 75
Val Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg
80 85 90

(2) 配列番号 7 の情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 27アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(v) フラグメント型 : 中間部

(xi) 配列 (配列番号 7) :

Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val
1 5 10 15
Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val
20 25

TCACACG ATG AGG GGG GCA CTG CTT GTG CTG GCA TTG CTG GTG ACC
Met Arg Gly Ala Leu Leu Val Leu Ala Leu Leu Val Thr
-15 -10 -5
CAA GCG CTG GGC CTC AAG ATG GCG GAA ACT TGC CCC ATT TTT TAT GAC
Gln Ala Leu Gly Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp
1 5 10
GTC TTT TTT GGG GTG GCG AAT GGA AAT GAA TTA CTG TTG GAC TTG TCC
Val Phe Phe Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Asp Leu Ser
15 20 25
CTC ACA AAA GTC AAT GCT ACT GAA GCA GAG AGA ACA GGC ATG AAA AAA
Leu Thr Lys Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys
30 35 40
ATC CAG GAT TGC TAC GTG GAG AAC GGA CTC ATA TCC AGG GTC TTG GAT
Ile Gln Asp Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp
45 50 55 60
GGA CTA GTC ATG ACA ACC ATC AGC TCC AGC AAA GAT TGC ATG GGT GAA
Gly Leu Val Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu
65 70 75 80
GCA GTT CAG AAC ACC GTA GAA GAT CTC AAG CTG AAC ACT TTG GGG AGA
Ala Val Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg
85 90 95
TGAATCTTTT CCACGATGC CCTTCTGAG CCCCATCTC CTGCGCTGTT CTTTACACCT
AAAGCTGGAA TCAGACACG TGTCTGACC TAATCACTC TCAATCAGGC TGACTAGAT
AAATAACTG CATCTTAAAA AA
46 94 142 190 238 286 334 394 454 476

(2) 配列番号 6 の情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 109アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : 蛋白質

(xi) 配列 (配列番号 6) :

(2) 配列番号 8 の情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 27アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(v) フラグメント型 : 中間部

(xi) 配列 (配列番号 8) :

Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys
1 5 10 15
Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu
20 25

(2) 配列番号 9 の情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 26アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(v) フラグメント型 : 中間部

(xi) 配列 (配列番号 9) :

Phe Phe Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Asp Leu Ser Leu
1 5 10 15
Thr Lys Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg
20 25

(2) 配列番号10の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 19 アミノ酸
(B) 型: アミノ酸
(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号10):

Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr
1 5 10 15
Ser Pro Leu

(2) 配列番号11の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 19 アミノ酸
(B) 型: アミノ酸
(D) トポロジー: 直鎖状
(ii) 配列の種類: ペプチド
(v) フラグメント型: 中間部
(xi) 配列 (配列番号11):

Met Gly Glu Ala Val Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr
1 5 10 15
Leu Gly Arg

(2) 配列番号14の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 90 塩基対
(B) 型: 核酸
(C) 鎖の数: 一本鎖
(D) トポロジー: 直鎖状
(ii) 配列の種類: cDNA
(ix) 配列の特徴:
(A) 特徴を表す記号: CDS
(B) 存在位置: 10...90
(xi) 配列 (配列番号14):

GGGGGATCC AAA GCT CTG CCG GTT GTT CTG GAA AAC GCT CTT ATC CTG
1 5 10
Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys
15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90
AAA AAC TGC GTT GAC GCT AAA ATG ACC GAA GAA GAC AAA GAA
Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu
15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90

(2) 配列番号15の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 27 アミノ酸
(B) 型: アミノ酸
(D) トポロジー: 直鎖状
(ii) 配列の種類: 蛋白質
(xi) 配列 (配列番号15):

(2) 配列番号12の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 27 塩基対
(B) 型: 核酸
(C) 鎖の数: 一本鎖
(D) トポロジー: 直鎖状
(ii) 配列の種類: cDNA
(ix) 配列の特徴:
(A) 特徴を表す記号: CDS
(B) 存在位置: 10...27
(xi) 配列 (配列番号12):

GGGGGATCC AAA GCT CTG CCG GTT GTT
1 5 10
Lys Ala Leu Pro Val Val

27

(2) 配列番号13の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 6 アミノ酸
(B) 型: アミノ酸
(D) トポロジー: 直鎖状
(ii) 配列の種類: 蛋白質
(xi) 配列 (配列番号13):

Lys Ala Leu Pro Val Val
1 5

Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys
1 5 10 15
Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu
20 25

(2) 配列番号16の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 63 塩基対
(B) 型: 核酸
(C) 鎖の数: 一本鎖
(D) トポロジー: 直鎖状
(ii) 配列の種類: cDNA
(iv) アンチセンス: YES
(xi) 配列 (配列番号16):

CAGAGACAGG TCCAGCAGCA GTTCCTTACC GTTAGCAACA GCGAAGAATT CTTTGTCTTC
TTC

63

(2) 配列番号17の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 21 アミノ酸
(B) 型: アミノ酸
(D) トポロジー: 直鎖状
(ii) 配列の種類: ペプチド
(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号 17) :

Glu Glu Asp Lys Glu Phe Phe Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Asp Leu Ser Leu
 20

(2) 配列番号 18 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ : 45 塩基対
 (B) 型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 一本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : cDNA

(ix) 配列の特徴 :

- (A) 特徴を表す記号 : CDS
 (B) 存在位置 : 1...45

(xi) 配列 (配列番号 18) :

CTG GAC CTG TCT CTG ACC AAA GTT AAC GCT ACC GAA CCG GAA CCG
 Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg
 1 5 10 15

(2) 配列番号 19 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ : 15 アミノ酸
 (B) 型 : アミノ酸
 (D) トポロジー : 直鎖状

Thr Glu Pro Glu Arg Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr
 1 5 10 15
 Pro Asp

(2) 配列番号 22 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ : 89 塩基対
 (B) 型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 一本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(ix) 配列の特徴 :

- (A) 特徴を表す記号 : CDS
 (B) 存在位置 : 1...63

(xi) 配列 (配列番号 22) :

ACC GGT ACC CCG GAC GAA TAC GTT GAA CAG GTT GCT CAG TAC AAA GCT
 Thr Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala
 1 5 10 15
 CTG CCG GTT TAG TAGCTAGAC TCGAAGCT TCGATCCC
 Leu Pro Val
 20

(2) 配列番号 23 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ : 19 アミノ酸
 (B) 型 : アミノ酸

(ii) 配列の種類 : 蛋白質

(xi) 配列 (配列番号 19) :

Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg
 1 5 10 15

(2) 配列番号 20 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ : 54 塩基対
 (B) 型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 一本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : cDNA

(iv) アンチセンス : YES

(xi) 配列 (配列番号 20) :

GTCCGGGGA CCGGTCAAGG ACAGGTCAAC GTCAAGTTTA CATTCCGGTT CCGT

54

(2) 配列番号 21 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ : 18 アミノ酸
 (B) 型 : アミノ酸
 (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(v) フラグメント型 : 中間部

(xi) 配列 (配列番号 21) :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : 蛋白質

(xi) 配列 (配列番号 23) :

Thr Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala
 1 5 10 15
 Leu Pro Val

(2) 配列番号 24 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ : 44 塩基対
 (B) 型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 一本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : cDNA

(iv) アンチセンス : YES

(xi) 配列 (配列番号 24) :

GGGATCCAA GCTTCTGAG TCTAGACTAC TAAACCGCA GAGC

44

(2) 配列番号 25 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ : 4 アミノ酸
 (B) 型 : アミノ酸
 (D) トポロジー : 直鎖状

- (ii) 配列の種類：ペプチド
 (v) フラグメント型：中間部
 (xi) 配列（配列番号25）：

Ala Leu Pro Val
 1

(2) 配列番号26の情報：

- (i) 配列特性：
 (A) 長さ：41塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：cDNA
 (ix) 配列の特徴：
 (A) 特徴を表す記号：CDS
 (B) 存在位置：9...41
 (xi) 配列（配列番号26）：

GGGATCC GAA GAA GAC AAA GAA AAC GCT CTG TCT CTG CTG
 Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu
 1 5 10

(2) 配列番号27の情報：

- (i) 配列特性：
 (A) 長さ：11アミノ酸
 (B) 型：アミノ酸

Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Lys Ala Leu Pro
 1 5 10 15
 Val Val Leu Glu
 20

(2) 配列番号30の情報：

- (i) 配列特性：
 (A) 長さ：54塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：cDNA
 (iv) アンチセンス：YES
 (xi) 配列（配列番号30）：

TTCAAGGCTG TTCTGAACAG CTTCACCCAT AACCGCAGAG GCTTTTACT GAGC

(2) 配列番号31の情報：

- (i) 配列特性：
 (A) 長さ：18アミノ酸
 (B) 型：アミノ酸
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：ペプチド
 (v) フラグメント型：中間部
 (xi) 配列（配列番号31）：

- (D) トポロジー：直鎖状

- (ii) 配列の種類：蛋白質
 (xi) 配列（配列番号27）：

Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu
 1 5 10

(2) 配列番号28の情報：

- (i) 配列特性：
 (A) 長さ：60塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：cDNA
 (iv) アンチセンス：YES
 (xi) 配列（配列番号28）：

TTCCAGAAC AACGGCAGAG CTTCAGCG AGAGGTCTAG ATTTTCTCCA GCAGAGACAG 60

(2) 配列番号29の情報：

- (i) 配列特性：
 (A) 長さ：20アミノ酸
 (B) 型：アミノ酸
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：ペプチド
 (v) フラグメント型：中間部
 (xi) 配列（配列番号29）：

Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Met Gly Glu Ala Val Gln Asn Thr
 1 5 10 15
 Val Glu

(2) 配列番号32の情報：

- (i) 配列特性：
 (A) 長さ：65塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：cDNA
 (ix) 配列の特徴：
 (A) 特徴を表す記号：CDS
 (B) 存在位置：1...45
 (xi) 配列（配列番号32）：

CAG AAC ACC GTT GAA GAC CTG AAA CTG AAC ACC CTG GGT TGAATGTAAC 52
 Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg 15

TCACAGATTC CCC 65

(2) 配列番号33の情報：

- (i) 配列特性：
 (A) 長さ：14アミノ酸
 (B) 型：アミノ酸
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：蛋白質
 (xi) 配列（配列番号33）：

Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg
1 5 10

(2) 配列番号34の情報を:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 20塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号: CDS
- (B) 存在位置: 9...20

(xi) 配列 (配列番号34):

GGGATCC GAA GAA GAC AAA
Glu Glu Asp Lys
1

(2) 配列番号35の情報を:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 4アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 蛋白質

(xi) 配列 (配列番号35):

Glu Glu Asp Lys
1

- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号: CDS
- (B) 存在位置: 1...288

(xi) 配列 (配列番号38):

ATG GGT CAC CAC CAC CAC CAC GAA TTC CTG GTC CCG GGT GGA TCC
Met Gly His His His His His His Glu Phe Leu Val Pro Arg Gly Ser
1 5 10 15
AAA GCT CTG CCG GTT GTT CTG GAA AAC GCT GTC ATC CTG AAA AAC TGC
Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys
20 25 30
GTT GAC GCT AAA ATG ACC GAA GAA GAC AAA GAA TTC TTC GCT GTT GCT
Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Phe Phe Ala Val Ala
35 40 45
AAC GGT AAC GAA CTG CTG CTG GAC CTG TCT CTG ACC AAA GTT AAC GCT
Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val Asn Ala
50 55 60
ACC GAA CCG GAA GCT AAA GCT GAC GTT GAC CTG TTC CTG ACC GGT ACC
Thr Glu Pro Glu Arg Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr
65 70 75 80
CCG GAC GAA TAC GTT GAA CAG GTT GCT CAG TAC AAA GCT CTG CCG GTT
Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val
85 90 95

(2) 配列番号39の情報を:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 96アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 直鎖状

(2) 配列番号36の情報を:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 35塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(iv) アンテセンス: YES

(xi) 配列 (配列番号36):

GGGATTCCT GCACTTACAT TCACTCCCC AAAAT

35

(2) 配列番号37の情報を:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 4アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号37):

Thr Leu Gly Arg
1

(2) 配列番号38の情報を:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 288塩基対
- (B) 型: 核酸

(ii) 配列の種類: 蛋白質

(xi) 配列 (配列番号39):

Met Gly His His His His His His Glu Phe Leu Val Pro Arg Gly Ser
1 5 10 15
Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys
20 25 30
Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Phe Phe Ala Val Ala
35 40 45
Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val Asn Ala
50 55 60
Thr Glu Pro Glu Arg Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr
65 70 75 80
Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val
85 90 95

(2) 配列番号40の情報を:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 27塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号40):

GGGGAATTCA AGAGGATGT TGACCTA

27

(2) 配列番号41の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 6 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号41):

Lys Arg Asp Val Asp Leu
1 5

(2) 配列番号42の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 27塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号42):

CTACCTGTAT TTTTTCGGT GCCCAAT

27

(2) 配列番号43の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 9 アミノ酸

(2) 配列番号45の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 9 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号45):

Pro Glu Arg Lys Ala Leu Pro Val Val
1 5

(2) 配列番号46の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 36塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号46):

ATTGCCACC GCAGAAATA CAGGTAGTC TTGTA

36

(2) 配列番号47の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 12 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号43):

Leu Pro Val Phe Phe Ala Val Ala Asn
1 5

(2) 配列番号44の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 27塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号44):

CCAGAGAGAA AAGCACTACC TGTAGTA

27

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号47):

Asn Ala Val Ala Phe Phe Val Pro Leu Ala Lys Tyr
1 5 10

(2) 配列番号48の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 27塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号48):

TAATGCTTTT CTCTCTGGTT CAGTAAC

27

(2) 配列番号49の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 9 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号 49) :

Leu Ala Lys Arg Glu Pro Glu Thr Ala
1 5

(2) 配列番号 50 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ: 29 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号 50) :

GGGATGCTT ACTGCTTATC CTCCTCTGT
29

(2) 配列番号 51 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ: 6 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号 51) :

Glu Lys Asp Glu Glu Thr
1 5

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号 54) :

GATTAAGGAGA AGAAGGATGT TGACCTA
27

(2) 配列番号 55 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ: 9 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号 55) :

Asp Lys Glu Lys Arg Asp Val Asp Leu
1 5

(2) 配列番号 56 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ: 27 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(2) 配列番号 52 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ: 27 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号 52) :

GGGGAATCA AAGCACTACC TGTAGTA
27

(2) 配列番号 53 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ: 6 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号 53) :

Lys Ala Leu Pro Val Val
1 5

(2) 配列番号 54 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ: 27 塩基対

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号 56) :

CTACCTGTAT TTTTTCGGT GGCCTAT
27

(2) 配列番号 57 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ: 9 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号 57) :

Leu Pro Val Phe Phe Ala Val Ala Asn
1 5

(2) 配列番号 58 の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ: 36 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号 58) :

TAGGTCAACA TCCCTCTCTCT CCTTATCCCTC TCTCT

36

(2) 配列番号59の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 12 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号59):

Leu Asp Val Asp Arg Lys Glu Lys Asp Glu Glu Thr
1 5 10

(2) 配列番号60の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 27 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号60):

CCCAAAAAT ACAGGTAGT CTTTCTA

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号63):

Arg Glu Pro Glu Thr Ala
1 5

(2) 配列番号64の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 27 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号64):

GGGGAATCT TTCCGCTGC CAATGA

(2) 配列番号65の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 7 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号65):

(2) 配列番号61の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 9 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号61):

Ala Phe Phe Val Pro Leu Ala Lys Tyr
1 5

(2) 配列番号62の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 29 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号62):

GGGGATCCTT ATCTCTCTGG TTCACTAGC

39

(2) 配列番号63の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 6 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

Phe Phe Ala Val Ala Asn Gly
1 5

(2) 配列番号66の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 21 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号66):

AAGAGGATG TTGACCTATT C

21

(2) 配列番号67の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 7 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号67):

Lys Arg Asp Val Asp Leu Pro
1 5

(2) 配列番号68の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 39塩基対
(B) 型: 核酸
(C) 鎖の数: 一本鎖
(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号68):

TAGGTGAACA TCCCTCTTTC TCCTGTGGTTC AGTAGCATT

(2) 配列番号69の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 13アミノ酸
(B) 型: アミノ酸
(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号69):

Leu Asp Val Asp Arg Lys Arg Glu Pro Glu Thr Ala Asn
1 5 10

(2) 配列番号70の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 32塩基対
(B) 型: 核酸
(C) 鎖の数: 一本鎖

Leu Val Pro Arg Gly Ser
1 5

(2) 配列番号73の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 10アミノ酸
(B) 型: アミノ酸
(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号73):

Met Gly His His His His His His Glu Phe
1 5 10

(2) 配列番号74の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 6アミノ酸
(B) 型: アミノ酸
(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号74):

Gly Ala Ala Thr Thr Cys
1 5

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号70):

GGGAGCTCTC ACTCTTATC CTCTCTCTC AT

33

33

(2) 配列番号71の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 7アミノ酸
(B) 型: アミノ酸
(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号71):

Glu Lys Asp Glu Glu Thr Met
1 5

(2) 配列番号72の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 6アミノ酸
(B) 型: アミノ酸
(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号72):

(2) 配列番号75の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 6アミノ酸
(B) 型: アミノ酸
(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号75):

Gly Gly Ala Thr Cys Cys
1 5

(2) 配列番号76の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 14アミノ酸
(B) 型: アミノ酸
(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号76):

Met Gly His His His His His His Leu Val Pro Arg Gly Ser
1 5 10

(2) 配列番号77の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 20アミノ酸

配列

X	K	R	D	V	D	L	F	L	T	G	T	P	D	E	Y	V	E	Q	V	A	Q	Y	K	A	L	P	V
Y	K	A	L	P	V	V	L	E	N	A	R	I	L	K	N	C	V	D	A	K	M	T	E	E	D	K	E
Z	F	F	A	V	A	N	G	N	E	L	L	D	L	S	L	T	K	V	N	A	T	E	P	E	R		
A	E	E	D	K	E	N	A	L	S	L	L	D	K	I	Y	T	S	P	L								
B	N	G	E	A	V	Q	N	T	V	E	D	L	K	I	N	T	L	G	R								
C	T	E	E	D	K	E	N	A	L	S	L	L	D	K	I	Y	T	S	P	L							

Fig. 4

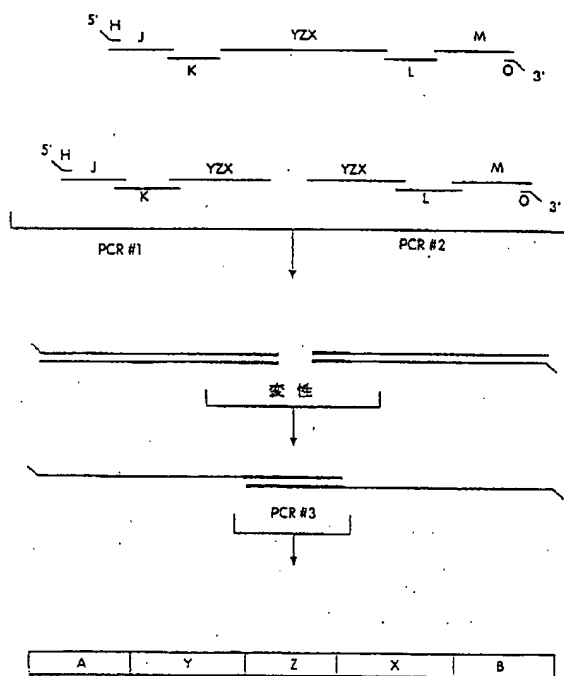


Fig. 6

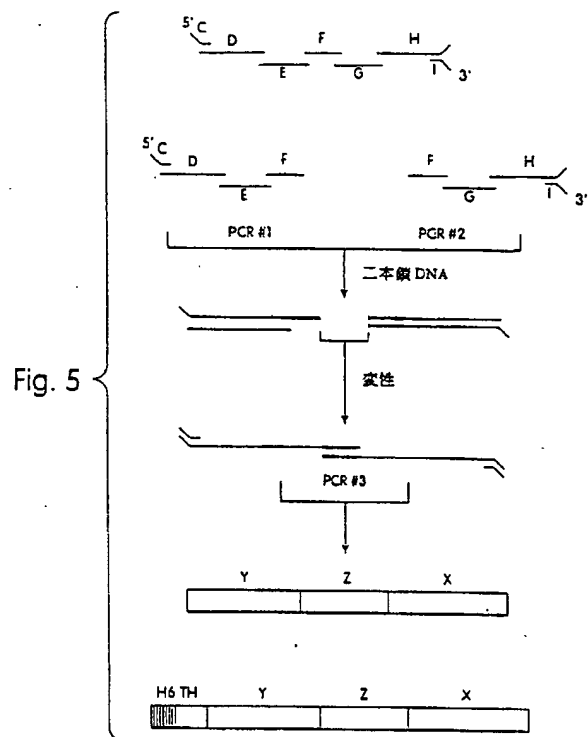


Fig. 5

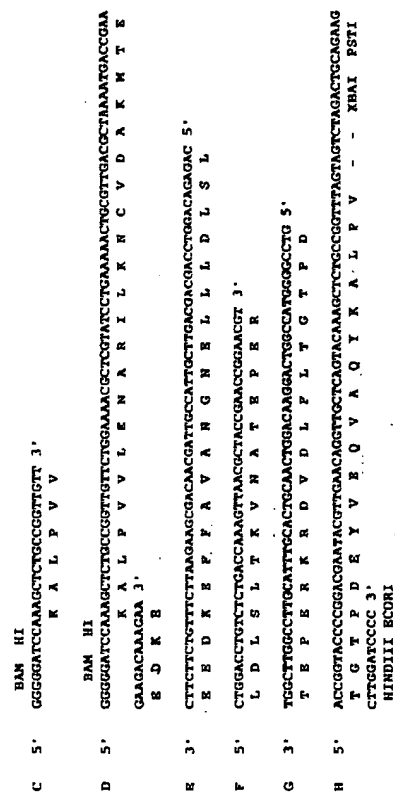


Fig. 7

I 3' CGAGCGCCAAATCATCATGATCTGACGCTTCGACCTAGGG 5'
A L P V - - XBAI PSTI HINDII ECORI

J 5' GGGATCCGAAGAGACAAAGAAAGCCCTCTCTCTCTGCTG 3'
BAM HI E B D K E N A L S L L

K 3' GACAGACGACCTGTTTACATGCTGGAGAGGCGACTTTCGAGAGCGCCACAGACCTT 5'
L S L L D K I Y T S P L K A L P V V L E

L 3' CGAGTCATGTTTCGAGAGCGCCATACCTCTCGACAAAGCTCTTGTGGCACTT 5'
A Q Y K A L P V M G E A V Q N T V E

M 5' CAGACACGCTTGAGACCTGAACTGACACACCTGGCTGTGATGTATCTGCAATTCCTC 3'
Q N T V E D L K L N T L G R - PST I ECORI

N 5' GGGATCCGAAGAGACAA 3'
BAM HI E E D K

O 3' TGAACCCCTCTACTTACATTTGAGCTTTAAGGG 5'
T L G R - PST I ECORI

Fig. 7 cont.

ATGGTCCACCACCCACCACCAATTCCTGGTCCGCTGGATCC
M G H H H H H E F L V P R G S

AAAGCTCTGCGGTTGTTCTGGAAAGCTCTGATCTGAAAACTGC
K A L P V V L E N A R I L K N C

GTTGACGCTAAATGACCGAAGAGACAAAGAAATTCCTGCTGTGCT
V D A K M T E E D K E F F A V A

AACGGTACGAACTGCTGCTGGACCTGCTCTGACCAAGTTAACCT
N G N E L L D L S L T K V N A

ACCGAACCGAAGCTTAACGTCAGCTGACCTGTTCTGACCGGTACC
T E P E R K R D V D L P L T G T

CCGACGAAATGCTTGAACAGGTTGCTCAGTACAAAGCTCTGCCGGTT
P D E Y V E Q V A Q Y K A L P V

Fig. 8

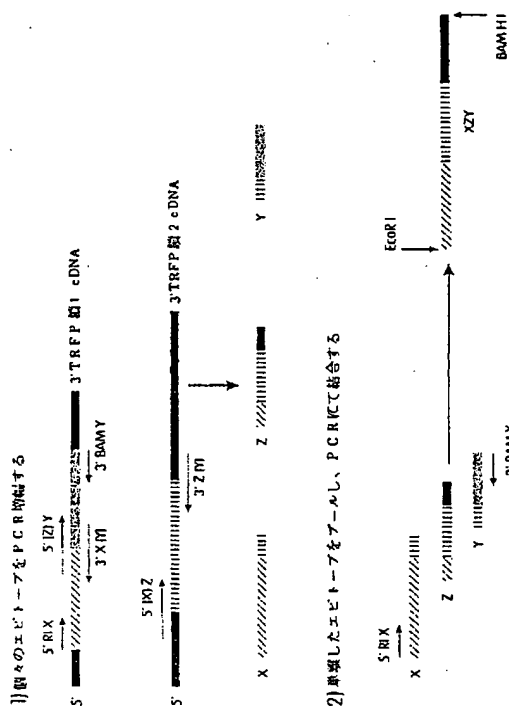


Fig. 9

5' プライマー

XYZ 構築

5' XRI 5'-GGGGAATTCAAGAGGGGATGTTGACCTA-3'
ECOR I X

5' (X) Z 5'-CTACCTGTATTTTTCGGGTGGCCAAT-3'
X Z

5' (Z) Y 5'-CCAGAGAGAAAGCACTACCTGTAGTA-3'
Z Y

YXZ 構築

5' YRI 5'-GGGGAATTCAAGAGCACTACCTGTAGTA-3'
ECOR I Y

5' (Y) X 5'-GATAAGGAGAGAGGGGATGTTGACCTA-3'
Y X

5' (X) Z 5'-CTACCTGTATTTTTCGGGTGGCCAAT-3'
X Z

ZXY 構築

5' ZRI 5'-GGGGAATTCTTTTCGGGTGGCCAATGGA-3'
ECOR I Z

5' (Z) X 5'-AAGAGGGATGTTGACCTATTC-3'
X

Fig. 10

3' プライマー

XZY 例案

3' X (Z) 5'-ATTGGCCACCGCAAAAAATCAGGTAGTGCCTTTGTA-3'
 Y
 3' Z (Y) 5'-TAGTGCTTTCTCTCTGTTTCAGTACC-3'
 | Z
 BAMH I Y
 ↓ ↓
 3' Y BAM 5'-GGGGATCCTTACTCTCTTATCCTCTCTTGT-3'
 BAMH I Y

YXZ 212 05

3' Y' (X) 5'-TAGGTCACACATCCCTCTTCTCTTATCCTCTTCTGT-3'
X Y
3' X (Z) 5'-CGCAAAAAATCAGGAGTAGTCTTGTGA-3'
Z X
3' Z BAM 5'-GGGGATCCTTATCTCTCTGGTTCAGTAGC-3'
BAM I Z

ZXY 問答

3' Z (X) 5'-TAGGTCACACATCCCTCTCTCTCTCTGGTTTCAGTAGCATT-3'
X Z

3' Y BAM 5'-GGGGATCCCTCACTCCTTATCTCTCTCTCTGTCAT-3'
BAM I Y

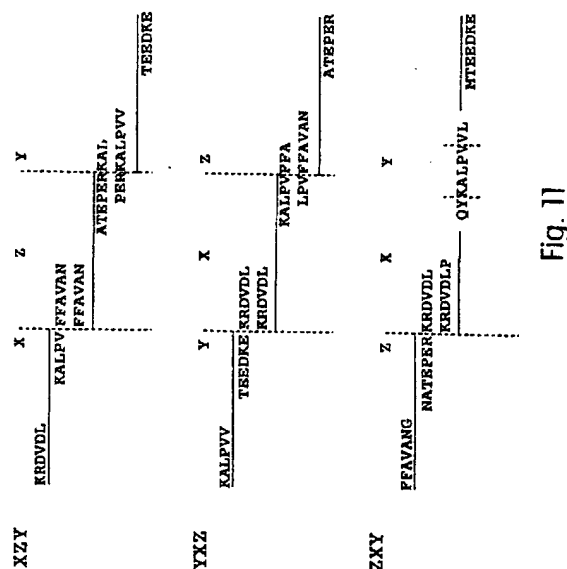


Fig. 10 cont.

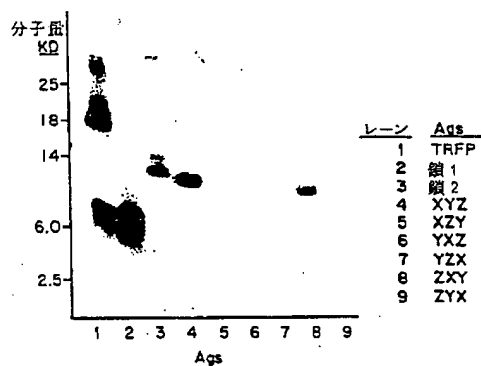
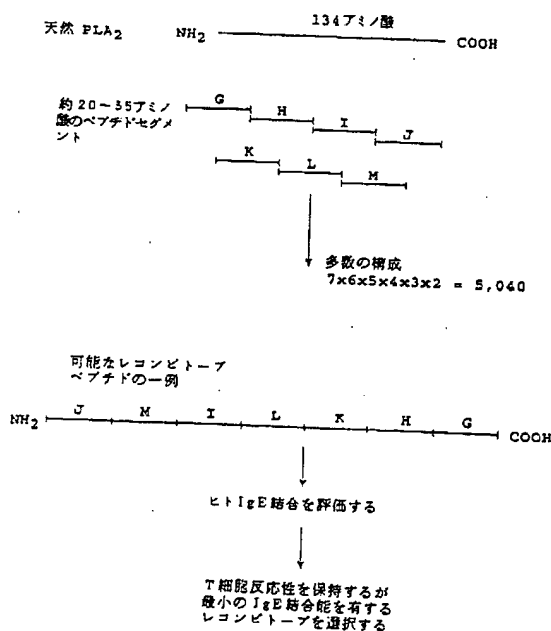


Fig. 13

Fig. 12

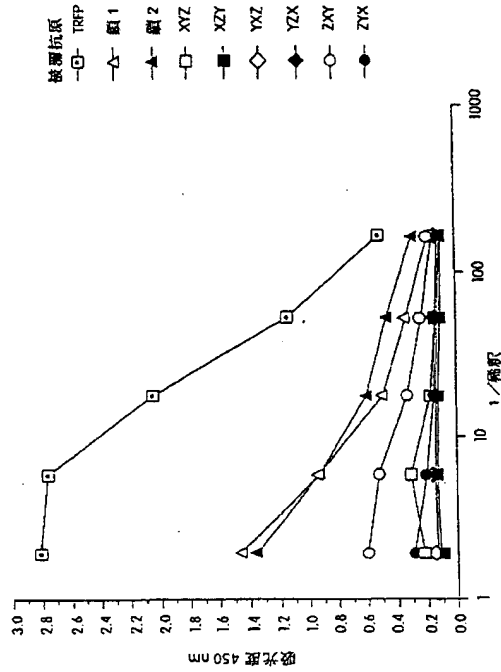


Fig. 14

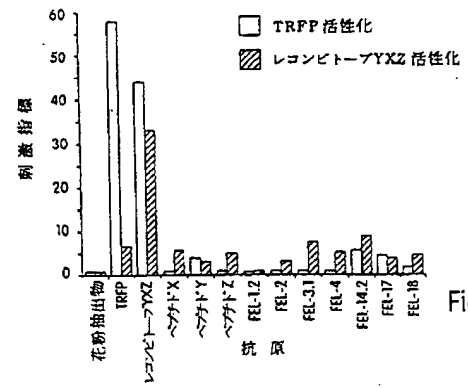


Fig. 15a

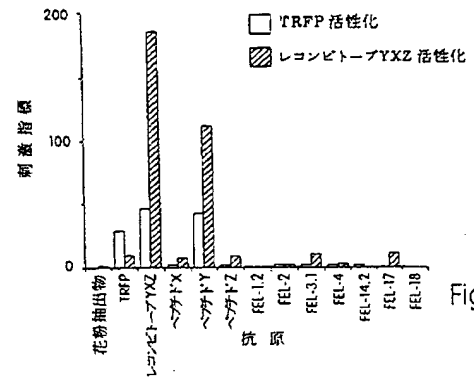


Fig. 15b

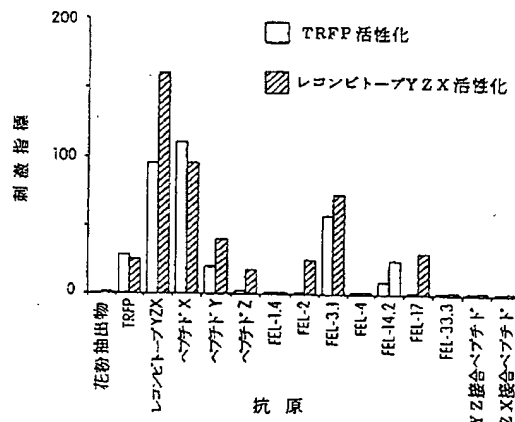


Fig. 15c

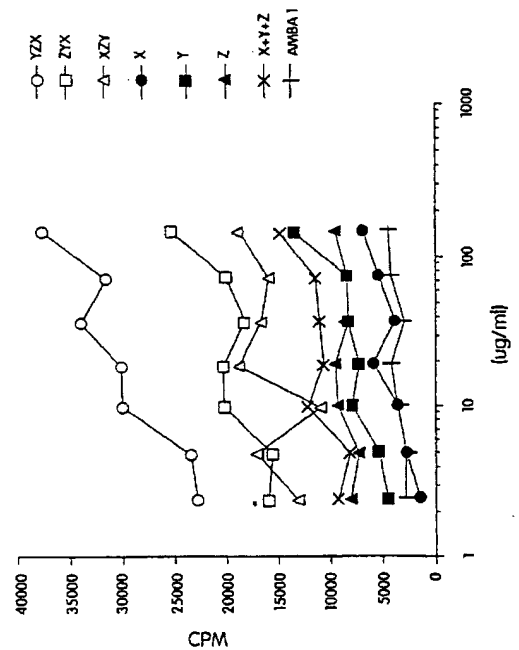


Fig. 16

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If search information within body, under what?) According to International Patent Classification (IPC) in its latest version: Classifications and IPC Int. Cl. 5 C12N15/12; A61K39/35; C12N15/62; G01N33/53 C07K7/10; C07K15/08; A61K39/35	
R. FIELD OF SEARCH Classifications searched: C12N15/12; A61K39/35; C12N15/62; G01N33/53 Int. Cl. 5 C07K7/10; C07K15/08; A61K39/35	
II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category: Y Date of actual completion of the international search: 18 JANUARY 1993 Date of filing of the international search report: 18 JANUARY 1993 International Searching Authority: EUROPEAN PATENT OFFICE Signature of Authorizing Officer: ANDRES S.M.	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET) Category: Y Date of actual completion of the international search: 18 JANUARY 1993 Date of filing of the international search report: 18 JANUARY 1993 International Searching Authority: EUROPEAN PATENT OFFICE Signature of Authorizing Officer: ANDRES S.M.	
--	--

Box I: Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Box I of first sheet) This international search report has been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: 1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos. 45-47, 51-58, 67-68, 88-89, 92-94, 96 are directed to a method of (diagnostic method) practised on the human/animal body the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition. 2. <input type="checkbox"/> Claims Nos. 45-47, 51-58, 67-68, 88-89, 92-94, 96 are directed to a method of (diagnostic method) practised on the human/animal body the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition. 3. <input type="checkbox"/> Claims Nos. 45-47, 51-58, 67-68, 88-89, 92-94, 96 are directed to a method of (diagnostic method) practised on the human/animal body the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition. 4. <input type="checkbox"/> Claims Nos. 45-47, 51-58, 67-68, 88-89, 92-94, 96 are directed to a method of (diagnostic method) practised on the human/animal body the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
---	--

The number first the current family members relating to the current document filed in the international search report. The numbers are not contained in the European Patent Office (EPO) file as the European Patent Office is not yet able to issue patent numbers which are merely given for the purpose of information. 18/01/93

Patent document date of search report	Publication date	Parent family member(s)	Publication date
WO-A-9106571	16-05-91	AU-A- 6733690 EP-A- 0500785	31-05-91 02-09-92
EP-A-0367306	09-05-90	JP-A- 2136130	28-05-90
WO-A-9204445	19-03-92	AU-A- 8506291	30-03-92

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁴	識別記号	序内整理番号	F I
C 0 7 K 19/00		8318 -4H	
C 1 2 N 15/09			
G 0 1 N 33/53	Q	8310-2J	
	D	8310-2J	

//(C 1 2 P 21/02
C 1 2 R 1:19)

(81) 指定国 EP (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, S E), A U, C A, F I, H U, J P, K R, N O

(72) 発明者 モーゲンスターン, ジェイ ビー.
アメリカ合衆国 02116 マサチューセツ,
ボストン, マルボロ ストリート 322

(72) 発明者 ボンド, ジュリアン エフ.
アメリカ合衆国 02188 マサチューセツ,
ウェイマス, コマーシャル ストリート 294

(72) 発明者 ガーマン, リチャード ディー.
アメリカ合衆国 02174 マサチューセツ,
アーリントン, フェセンデン ロード 21

(72) 発明者 クオ, メイチャン
アメリカ合衆国 01890 マサチューセツ,
ウィンチェスタ, コクス ロード 5

(72) 発明者 モービル, マルコム
アメリカ合衆国 06385 コネティカット,
ウォータフォード, トウィン レイクス
ドライブ 17

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.